Die Ascosporenbildung von Saccharomyces cerevisiae in Abhängigkeit von der Vorkultur und unter dem Einfluß sichtbaren Lichtes

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Gisela Keup
aus Berlin

Würzburg 1967

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544722_0030

Die Ascosporenbildung von Saccharomyces cerevisiae in Abhängigkeit von der Vorkultur und unter dem Einfluß sichtbaren Lichtes

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Gisela Keup
aus Berlin

Würzburg 1967

Referent: Universitätsdozentin Dr. M. Ehrenberg
Korreferent: Prof. Dr. W. Simonis

Tag der Einreichung: 30.5.1967
Tag der mündlichen Prüfung: 26.Juli 1967
Dr.Urkunde am: 15. 9 67

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die vorliegende Arbeit wurde im Botanischen Institut der Universität Würzburg angefertigt.

Frau Universitätsdozentin Dr. M. Ehrenberg, unter deren Anleitung die Untersuchungen durchgeführt wurden, danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und ihre Unterstützung.

Auch dem Leiter des Institutes, Herrn Prof. Dr. W. Simonis, danke ich für seine Förderung.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	
1. Material	3
2. Kultur vegetativer und sporulierender Hefen	3
3. Meßmethoden	6
4. Statistik	7
III. Versuchsergebnisse	
1. Die vegetative Vermehrung und der Einfluß der Vorkultur auf die Ascosporenbildung. (Experimente und Diskussion der Ergebnisse)	9
a) Die Vorkultur	10
b) Die Sporulation in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Entnahme aus der Vorkultur	21
2. Der Einfluß sichtbaren Lichtes auf die Sporulation	36
a) Belichtung der Sporulationskultur	36
α) Der Einfluß von Weißlicht	36
β) Der Einfluß von hellrotem und blauem Licht	49
b) Belichtung der Vorkultur. Einfluß auf die verschiedenen Wachstumsphasen sowie auf die nachfolgende Sporulation	53
IV. Diskussion der Lichtwirkungen	64
V. Zusammenfassung	69
Literaturverzeichnis	71

I. Einleitung.

Für eine Reihe von Pilzen ist bekannt, daß beim Übergang von der vegetativen in die reproduktive Phase sichtbares Licht eine wesentliche Rolle spielt (HAWKER 1957). Diese Beobachtung wurde auch an Hefen gemacht (OPPENOORTH 1957) und ist der Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit. OPPENOORTH fand bei Saccharomyces carlsbergensis eine fördernde Wirkung von weißem und hellrotem Licht auf die Ascosporenbildung. Die vegetative Phase von Saccharomyces cerevisiae wird dagegen durch Weißlicht gehemmt (BUCHTA 1914, HUTCHINSON und NEWTON 1930, MATILE und FREY-WYSSLING 1962, MATILE 1962, EHRENBERG 1964 und 1966).

Allgemein ist beobachtet worden, daß vegetative und sexuelle Vermehrung bei Hefen sich ausschließen, d.h. unter günstigen Wachstumsbedingungen tritt keine Sporulation ein, während umgekehrt Faktoren, die die Sporulation begünstigen, keine Zellvermehrung zulassen. Da nun für Hefen wachstumshemmende und sporulationsfördernde Lichtwirkungen beschrieben worden waren, wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, daß die von OPPENOORTH beobachtete Förderung der Sporulation durch Licht die Folge einer lichtinduzierten Wachstumshemmung sein könnte. Es sollte versucht werden, durch eine Analyse der durch Licht ausgelösten Phänomene neue Einblicke in die zur Sporulation führenden Prozesse zu erzielen.

Über die äußeren und inneren Faktoren, die die Hefezelle zur Ascosporenbildung und damit zur Durchführung einer Meiose statt einer Mitose veranlassen, liegen bisher trotz zahlreicher Untersuchungen noch wenig übereinstimmende und für alle Hefen gleichermaßen gültige Ergebnisse vor. Die Ursache dafür ist in den sehr verschiedenen Ansprüchen der jeweils verwendeten Hefen zu suchen und nicht zuletzt in den sehr unterschiedlichen Methoden, die in den einzelnen Arbeiten zur Anwendung kamen. Es schien daher notwendig, zunächst die vegetative Kultur eines Stammes von Saccharomyces cerevisiae in einem definierten Medium genau zu charakterisieren und die Abhängigkeit des Sporulationsverlaufes von Zellen

aus einer solchen Kultur zu ermitteln. Im zweiten Teil der Arbeit werden dann, ausgehend von diesen Normalbedingungen, die durch Belichtung verursachten Veränderungen in Vor- und Sporulationskultur untersucht.

II. Material und Methoden.

1. Material.

Die verwendete Hefe Saccharomyces cerevisiae Stamm Ha war aus Bäckerhefe als Einzellkultur gewonnen worden (EHRENBERG 1961). Die Stammkulturen wurden in Reagensgläsern auf Schrägagar (Hefe-Morphologie-Agar nach WICKERHAM 1951, modifiziert nach EHRENBERG 1960) im Kühlschrank bei 4°C gehalten. Bei den Versuchen wurde von 6 Monate alten Stammkulturen ausgegangen und zunächst eine neue Schrägagarkultur hergestellt, die zum Anwachsen 2 Tage bei Zimmertemperatur (18-24°C) im Dunkeln gehalten und danach bis zum Versuch 3-10 Tage im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt wurde. Mit Zellen dieser Kultur wurde das eigentliche, flüssige Vorkulturmedium (s.u.) beimpft.

2. Kultur vegetativer und sporulierender Hefen.

Die Nährlösung für die als Vorkultur bezeichnete Anzucht vegetativer Hefen entsprach dem Hefe-Morphologie-Agar nach WICKERHAM (1951), jedoch ohne Agar und mit der 1,5-fachen $CaCl_2$-Konzentration. Es hatte sich gezeigt, daß sich ein höherer Gehalt an Ca-Ionen im Vorkulturmedium günstig auf die Sporulation auswirkt. Die Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung:

Ad 1000 ml aqua dest.:

S p u r e n e l e m e n t e

40 γ $CuSO_4 \times 5\ H_2O$
100 " KJ
200 " $FeCl_3 \times 6\ H_2O$
200 " $Na_4MoO_4 \times 2\ H_2O$
400 " $MnSO_4 \times 1\ H_2O$
400 " $ZnSO_4 \times 7\ H_2O$
500 " H_3BO_3

W u c h s s t o f f e

2 γ Biotin
2 " Folsäure
200 " Paraaminobenzoesäure
200 " Riboflavin
400 " Calciumpanthothenat
400 " Nicotinsäureamid
400 " Pyridoxinhydrochlorid
400 " Thiaminhydrochlorid
2000 " Inosit

A m i n o s ä u r e n

10 mg L-Histidin x 1 H_2O
20 mg DL-Methionin
20 mg DL-Tryptophan

S a l z e

0,10 g NaCl
0,15 g $CaCl_2$ x 6 H_2O
0,50 g $MgSO_4$ x 7 H_2O
1,00 g KH_2PO_4

S t i c k s t o f f q u e l l e n

1,5 g Asparagin
3,5 g $(NH_4)_2SO_4$

K o h l e n s t o f f q u e l l e

10,0 g Glucose

pH-Wert der Nährlösung ca. 5.

Abwandlungen dieses Mediums werden bei der Besprechung der Versuche angegeben.

Die Glucose wurde wie die übrige Nährlösung, aber getrennt von dieser, fraktioniert sterilisiert und erst vor Animpfen der Nährlösung unter sterilen Bedingungen zugefügt. Auf diese Weise wurde ein Karamellisieren der Glucose bei der Sterilisation verhindert.

Für die Vorkultur wurden Stehkolben mit doppelt durchbohrten Gummistopfen verwendet, durch deren Bohrungen ein bis zum Grunde des Kolbens führendes Glasrohr zum Einleiten der Preßluft und ein kurzes zum Entweichen der Luft führten. Den Abschluß der Glasrohre nach außen bildeten wattehaltige Glasviolen zum Schutz gegen Kontamination. Diese Kulturgefäße wurden mitsamt der Nährlösung sterilisiert. Das Vorkulturmedium wurde stets mit 120 000 Zellen/ml beimpft und die Kulturen bei 26°C im Wärmeschrank belüftet. Zur Belüftung, durch die die Hefen gleichmäßig in Suspension gehalten und genügend mit Sauerstoff versorgt werden sollten, diente Preßluft, die zuvor durch Passieren einer Wattesäule von Staubteilchen gereinigt, durch Einleiten in Kupfersulfat- und Quecksilberchloridlösung keimfrei gemacht und durch einen der Kultur im Wärmeschrank vorgeschalteten Wasserkolben eintemperiert worden war. Die Durchflußgeschwindigkeit der Preßluft betrug je nach Flüssigkeitsmenge 80-150 l/Std. Vorkulturversuche wurden nur vom Ansatz bis zur ersten Entnahme (bei einer Zelldichte von mindestens 10^6 Zellen pro ml) steril gehalten, da die intensive Vermehrung der Hefen ein Aufkommen von Bakterien nicht zuließ; dagegen wurde bei allen Sporulationsversuchen bis zum Ende steril gearbeitet.

Das Sporulationsmedium bestand, soweit nicht anders vermerkt, aus 0,05 M Kaliumacetat in M/15 Phosphatpuffer nach SÖRENSEN pH 6. K-Acetat wurde verwendet, weil in diesem die Mehrzahl der Asci 4-sporig war, während in Na-Acetat 2-sporige Asci überwogen. Vorversuche hatten gezeigt, daß die Sporulationsintensität in einem Konzentrationsbereich von 0,03 bis 0,08 M K-Acetat etwa gleich blieb. Der pH-Wert des Sporulationsmediums stieg von 6,0 auf 6,5-6,8 an.

Für die Sporulationskulturen wurden die Hefen durch Sterilfiltration (Filtrationsgerät für Druckfiltration, Typ PA_9, Membranfiltergesellschaft Göttingen) vom Vorkulturmedium abgetrennt, mit aqua dest. vom Filter gelöst und die Zelldichte eingestellt; sie betrug im Ansatz 10^7 Zellen pro ml $\pm$ 10%, am Ende der Versuche 1,3-1,5 x 10^7 Zellen pro ml. Die Belüftung der Sporulationskulturen geschah wie

bei den Vorkulturen bei 26°C und 80-150 l/Std.

Für Lichtversuche wurden die bei EHRENBERG (1966) beschriebene Beleuchtungsapparatur und Lichtquellen verwendet. Hier dienten als Kulturgefäße aufrecht stehende Kulturkolben nach KOLLE, die durch übergreifende Gummideckel verschlossen wurden. Die Versuchsapparatur bestand im Wesentlichen aus einem Thermostatenbad, das die im Dunkeln gehaltene Kontrollkultur enthielt, und einer vom Thermostatenwasser durchflossenen Plexiglasküvette, in die der belichtete Kolben eingespannt war. Die Belichtung erfolgte beidseitig senkrecht zu den Breitseiten des Kulturkolbens (daher wurde in den entsprechenden Versuchen die Beleuchtungsstärke in 2 x ... Lux bzw. erg angegeben). Als Lichtquellen wurden für Weißlicht Kryptonlampen verwendet, für Blaulicht Osram-Leuchtstoffröhren Type L 20 W/64 in Kombination mit Plexiglasfiltern "Blau 627" (Fa. Röhm u. Haas) und für Hellrot Leuchtstoffröhren Type L 20 W/31 R mit Plexiglasfiltern "Rot 502". Durch das Wasserbad sowie durch Wärmefilter (Exuroglas) an den Außenwänden der Plexiglasküvette und durch einen Ventilator fand in den belichteten Kulturen keine Temperaturerhöhung gegenüber den Kontrollen statt.

3. Meßmethoden.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte in der THOMA-Zählkammer. Bei dieser Methode wird die Gesamt-Zellzahl ermittelt; jedoch fanden sich oft in einem bestimmten Stadium der Kulturen dunkel erscheinende Zellen, die offensichtlich geschädigt waren und die sich nach einem Verfahren zur Bestimmung toter Hefezellen mit wäßriger gepufferter Methylenblaulösung 1:10 000 (STRUGGER 1949) anfärbten; diese Hefen wurden nicht mitgezählt.

Für Trockengewichtsbestimmungen wurden die Zellen mittels vorgewogener Blaubandfilter (Schleicher und Schüll, Nr.589^3) auf Steril-Filtrationsgeräten (Typ Stefi 4, Membranfiltergesellschaft Göttingen) vom Medium abgetrennt, dreimal mit aqua dest. gewaschen und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Bestimmung der Asci: Die Hefen wurden in homogener

Suspension auf Objektträger übertragen und lebend unter dem Mikroskop nach Gesichtsfeldern ausgezählt, da mit dieser Methode eine große Zahl in einer Probe erfaßt werden kann; das aufwendigere Auszählen der Asci in einer THOMA-Zählkammer von Objektträgerdicke ergab die gleichen Werte. Als Ascus wurde jede Zelle dann bezeichnet, wenn Plasmaportionen einzeln sichtbar waren, auch wenn die Wände der Sporen zu der Zeit noch nicht fertig ausgebildet waren. Für jeden Wert wurden fünfmal 200 Zellen gezählt und die Zahl der Asci in Prozent der Gesamt-Zellzahl angegeben.

Die Gaswechselmessungen erfolgten manometrisch nach der direkten Methode von WARBURG (s. UMBREIT, BURRIS und STAUFFER 1957); dabei wurden die Hefen in entsprechenden Zeitintervallen aus den Belüftungskulturen direkt in Warburggefäße übertragen (Ausnahmen werden bei der Besprechung der Versuche vermerkt).

Die Glucosemenge im Filtrat der Kulturflüssigkeit wurde im Wesentlichen nach der enzymatischen Methode von HUGGET und NIXON (1957) mit der Biochemica-Testkombination zur Bestimmung der "wahren Glucose" (TC-M, Boehringer) ermittelt.

Die Bestimmung des ins Medium abgegebenen Äthylalkohols erfolgte ebenfalls enzymatisch in Anlehnung an BÜCHER und REDETZKI (1951) mit der Biochemica-Testkombination "zur Bestimmung von Blutalkohol" (ADH-OP, Boehringer), und zwar in der Kulturflüssigkeit (nach Abzentrifugieren der Zellen in geschlossenen Zentrifugengläsern).

4. Statistik.

Bei einigen Sporulationsversuchen wurde für die erhaltenen Mittelwerte die Standardabweichung $S_{\bar{x}}$ (SCHNELL 1958) angegeben. Da die experimentellen Bedingungen die Annahme einer Normalverteilung zulassen, wurden die Ergebnisse einem t-Test unterworfen (PÄTAU 1943). Als signifikant verschieden wurden zwei Meßreihen dann betrachtet, wenn sich für ihre Identität eine Wahrscheinlichkeit von $p \leq 0{,}01$ (1 %) ergab. Für die 1-, 2- und 3-sporigen Asci (vergl. S. 26 u. 44) ließ sich auch dann ein Unterschied nicht ausschließen, wenn

diese Signifikanzschwelle nicht erreicht wurde; der Grund für Letzteres ist in dem geringen prozentualen Anteil dieser Asci an der Gesamtzahl der Asci und in der dadurch entstehenden relativ starken Streuung zu suchen. Zumindest sind auch in diesen Fällen die p-Werte z.T. recht klein. Daher wurden die p-Werte in den Tabellen mit aufgeführt.

III. Versuchsergebnisse.

1. Die vegetative Vermehrung und der Einfluß der Vorkultur auf die Ascosporenbildung.

(Experimente und Diskussion der Ergebnisse)

Die Ascosporenbildung der Hefen ist einerseits abhängig von den in der Sporulationskultur herrschenden Bedingungen, andererseits aber auch von den Bedingungen während der vorausgegangenen vegetativen Vermehrung. In den zusammenfassenden Übersichten über die die Sporulation beeinflussenden Faktoren (PHAFF und MRAK 1948 u. 1949, MILLER und HOFFMANN-OSTENHOF 1964) und in der weiteren Literatur finden sich nur wenige Angaben über diese letzteren Beziehungen zwischen den durch eine Vorkultur hervorgerufenen physiologischen Veränderungen in den Hefen und deren Sporulationsfähigkeit nach Übertragung in ein Sporulationsmedium: Bereits 1883 stellte HANSEN fest, daß nur junge, noch wachsende und gut genährte Zellen auch gut sporulieren. MILLER und Mitarb. (1955) fanden, daß Zellen aus einer 1-4 Tage alten Vorkultur besser sporulierten als solche aus einer 7-8 Tage alten Vorkultur, während Zellen nach 14-30 Tage langer Vorkultivierung noch schlechter sporulierten, und daß diese Abnahme der Sporulationsfähigkeit auf physiologischen Veränderungen in den Zellen beruhte, die jedoch keine nekrotischen Veränderungen waren. GREVE (1960) beobachtete, daß dem Anzuchtmedium nach 48 Std. entnommene Hefen regelmäßig 1-2 Std. früher sporulierten als nach 24 Std. entnommene Zellen. Bei PONTEFRACT und MILLER (1962) sporulierten die Hefen reichlicher bei einer Entnahme aus dem Anzuchtmedium nach 30-40 Std. als bei einer Entnahme nach 18-24 Std. FOWELL und MOORSE (1960) zeigten, daß optimale Sporulation dann eintrat, wenn die Hefen zu dem Zeitpunkt entnommen wurden, an dem 85-90 % des insgesamt in der Kultur gebildeten CO_2 frei geworden war. Diese wenigen Hinweise sowie eigene Vorversuche ließen es notwendig erscheinen, zunächst die Zusammenhänge zwischen vegetativer Anzucht und Sporulation genauer zu untersuchen.

In einem flüssigem Medium läßt sich unter geeigneten

Bedingungen bei einer kleinen Einsaat von Zellen das Wachstum der Hefen in Verzögerungsphase, exponentielle Wachstumsphase, stationäre Phase und Abnahmephase gliedern. Diese Idealkurve des Wachstums ist jedoch nicht immer verwirklicht, und die über den Verlauf der Wachstumskurve und über die Länge der einzelnen Phasen entscheidenden Faktoren sind so komplex, daß die Wachstumskurve für jeden Hefestamm und für jedes Medium neu ermittelt werden muß.

a) Die Vorkultur.

Nach Beimpfen der Nährlösung folgt auf eine kurze Verzögerungsphase eine Phase exponentieller Zellvermehrung, die "erste Vermehrungsphase". Die Zellzahl nimmt dabei von $1{,}2 \times 10^5$ auf $5{,}5 \times 10^7$ Zellen/ml zu, mit einer durchschnittlichen Generationszeit von 1,5-2 Std. Daran schließt sich eine Phase äußerst geringer Zellvermehrung an, die 2-4 Std. dauert; diese ist eine "zweite Verzögerungsphase", denn anschließend setzt erneute Zellvermehrung ein, die aber nur annäherungsweise exponentiell verläuft. Die Zellzahl verdoppelt bis verdreifacht sich dabei. Diese "zweite Vermehrungsphase" geht dann in die stationäre Phase über. Abb.1 zeigt als Beispiel die gesamte Vermehrung der Zellen einer Kultur; der gestrichelte Teil der Kurve ist extrapoliert, da eine Zellzahlbestimmung in der THOMA-Zählkammer zu Beginn der Kulturen wegen der geringen Zelldichte noch nicht möglich ist. In Abb.2 sind 6 verschiedene Wachstumskurven dargestellt, um die unter vergleichbaren Bedingungen bei verschiedenen Versuchen auftretenden Schwankungen im Kurvenverlauf zu veranschaulichen.

Die im Verlauf der Vorkultur auftretenden Phasen der Zellvermehrung lassen sich auch morphologisch recht gut charakterisieren: In der 1.Verzögerungsphase sowie in der frühen 1.Vermehrungsphase finden sich noch häufig Zellverbände. Im weiteren Verlauf der Zellvermehrung überwiegen ausgewachsene Zellen mit je einer verschieden großen Sproßzelle. In der 2.Verzögerungsphase werden kaum neue Sproßzellen gebildet, sondern die jungen Sproßzellen wachsen aus und lösen sich zum großen Teil von den Mutterzellen. In der

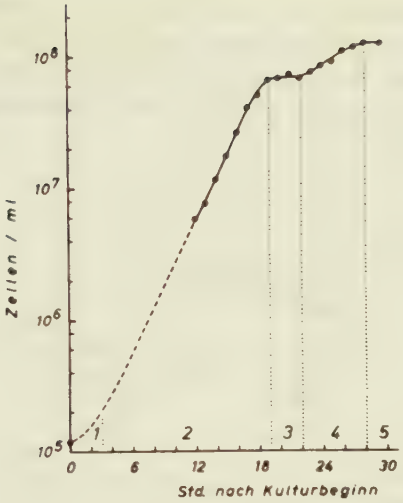

Abb.1. Zellvermehrung in der Vorkultur. Der gestrichelte Teil der Kurve ist extrapoliert. 1: 1.Verzögerungsphase; 2: 1.Vermehrungsphase; 3: 2.Verzögerungsphase; 4: 2.Vermehrungsphase; 5: stationäre Phase.

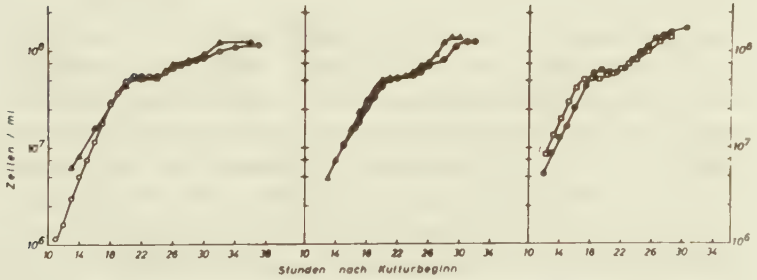

Abb.2. Zellvermehrung in der Vorkultur am Beispiel von sechs Versuchen.

2.Vermehrungsphase haben viele Zellen mehrere junge Sproßzellen (meist 2-4) von oft etwa gleicher Größe. In der frühen stationären Phase überwiegen wieder Einzelzellen, ihre Größe variiert sehr, und sie sind häufig stark vakuolisiert.

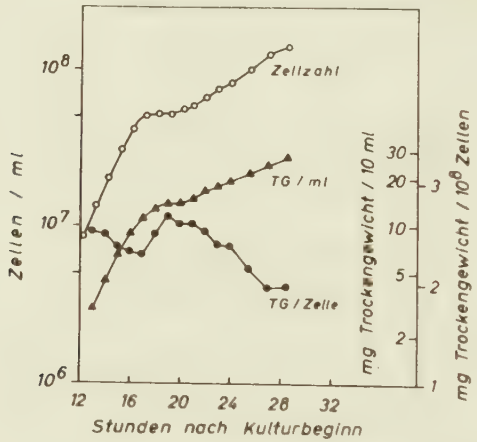

Abb.3. Zellvermehrung (Zellen/ml) und Wachstum (Trockengewicht/ml und Trockengewicht/Zelle) in der Vorkultur.

Der Kurvenverlauf des Trockengewichtes/ml ähnelt dem der Zellzahl, geht der Zellzahl aber nicht genau parallel (Abb.3); die 2.Verzögerungsphase ist weniger deutlich ausgeprägt, während die 2.Vermehrungsphase häufiger exponentiell verläuft als bei der Zellvermehrung. Die Unterschiede im Verlauf der Zellvermehrung und Trockengewichtszunahme zeigen sich deutlicher in der aus den beiden Kurven resultierenden Kurve des Trockengewichtes/Zelle (Abb.3): In der 1. und 2.Vermehrungsphase ist die Geschwindigkeit der Zellvermehrung größer als die Wachstumsgeschwindigkeit (Abfall des Trockengewichtes/Zelle), während in der 2.Verzögerungsphase das Wachstum nicht entsprechend der Zellzahl gehemmt ist (Anstieg des Trockengewichtes/Zelle). Abb.4 zeigt die Schwankungen im Kurvenverlauf des Trockengewichtes für 5

verschiedene Versuche.

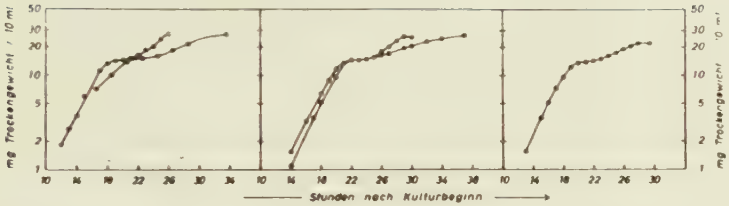

Abb.4. Wachstum (Trockengewicht/ml) in der Vorkultur am Beispiel von 5 Versuchen.

Die Ursachen für das Auftreten der verschiedenen Wachstums- und Zellvermehrungsphasen sind in Veränderungen des Nährmediums zu suchen (die z.B. in der starken Veränderung der H^+-Konzentration zum Ausdruck kommt, vergl. Abb.5 C). Ein wesentlicher Faktor für das Wachstum ist die Kohlenstoffquelle, in diesem Falle Glucose. Quantitative Glucosebestimmungen in der Nährlösung im Verlauf der Kultur ergaben, daß die Glucosekonzentration beim Übergang in die 2.Verzögerungsphase auf Null absinkt (Abb.5 D). Das Ende der 1.Vermehrungsphase erklärt sich also durch den Mangel an Glucose.

Obgleich also bereits vor der 2.Vermehrungsphase keine Glucose mehr in der Nährlösung ist, erfolgt in dieser Phase noch eine annähernde Verdoppelung des Trockengewichtes. Es muß also noch mindestens eine weitere Kohlenstoffquelle in der Nährlösung vorhanden sein. Die Nährlösung enthält anfangs an C-haltigen Verbindungen nur noch Asparagin. Da die 2.Vermehrungsphase unter bestimmten Bedingungen (vergl. S.61) auch in Abwesenheit von Asparagin auftritt, kann dieses hier als C-Quelle nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Wie Gaswechselmessungen während der verschiedenen Phasen der Kultur ergaben (Abb.5 E), überwiegt trotz aerober Bedingungen in der 1.Vermehrungsphase sehr stark der Gärungsstoffwechsel: Erst nach Verbrauch von etwa 50% der Glucose nimmt die Gärung schnell ab und sinkt mit vollständigem Verbrauch der Glucose auf Null. CO_2-Abgabe und O_2-Aufnahme

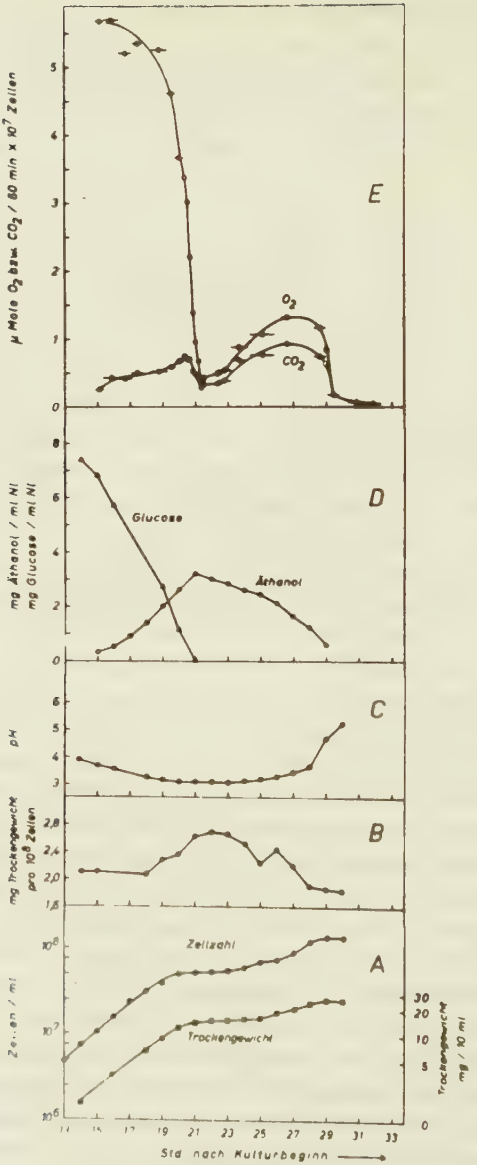
µ Mole O2 bzw. CO2 / 60 min x 10^7 Zellen
E
O2
CO2
mg Äthanol / ml NI
mg Glucose / ml NI
D
Glucose
Äthanol
pH
C
mg Trockengewicht pro 10^8 Zellen
B
Zellzahl
Trockengewicht
A
Std nach Kulturbeginn
mg / 10 ml

Abb.5. Zellvermehrung, Wachstum und Gaswechsel sowie Veränderungen der Nährlösung im Verlauf der Vorkultur.
A: Zellzahl und Trockengewicht/ml.
B: Trockengewicht/10^8 Zellen.
C: pH-Wert der Nährlösung.
D: Glucose- und Athanolgehalt der Nährlösung.
E: O_2-Aufnahme und CO_2-Abgabe der Zellen. (Für die Gaswechselmessungen wurden alle 2 Std. Proben aus der Vorkultur entnommen; die Punkte geben das Mittel der durch Querstriche dargestellten berechneten Meßstrecken an).

durchlaufen in der 2.Verzögerungsphase ein Minimum und nehmen danach wieder zu, wobei die O_2-Aufnahme über die CO_2-Abgabe steigt. Beide Kurven erreichen ein Maximum kurz vor Ende der 2.Vermehrungsphase. Der Respiratorische Quotient (RQ) liegt in dieser Phase zwischen 0,60 und 0,75. Zellvermehrung und Wachstum müssen also in der 2.Vermehrungsphase unter Verbrauch einer C-Quelle erfolgen, die sauerstoffärmer ist als Kohlenhydrate. Zu Beginn der stationären Phase sinken O_2-Aufnahme und CO_2-Abgabe plötzlich rasch ab und der RQ wird 1. In der späteren stationären Phase ist ein Gaswechsel kaum mehr meßbar.

Als oxidierbare C-Quelle kommt der während der 1.Vermehrungsphase bei der Vergärung von Glucose entstehende Äthylalkohol in betracht. Schon von STOCKHAUSEN (1911), LINDNER und CZISER (1912) sowie von LUNDIN (1923) wurde nachgewiesen, daß Saccharomyces zur Assimilation von Äthanol in der Lage ist. SWANSON und CLIFTON (1948) untersuchten das Wachstum von Saccharomyces cerevisiae in einem belüfteten Vitamin-Salz-Medium mit 1% Glucose: Das erste Stadium der Glucoseverwertung war fast ausschließlich fermentativ; anschließend erfolgte Oxidation und Assimilation des bei der Gärung gebildeten Äthanols, wobei weitere Zellvermehrung stattfand. Zu den gleichen Ergebnissen kam BATTLEY (1960). Beide Autoren geben jedoch keine Kurven für die Zellvermehrung an.

Um zu klären, wie weit Äthanol als Substrat für die 2.Vermehrungsphase in Frage kommt, wurde zunächst der Gehalt des Mediums an Äthanol im Verlauf der Kultur ermittelt und die in Abb.5 D dargestellte Kurve erhalten. Die Äthanolkonzentration steigt danach in der 1.Vermehrungsphase an und erreicht ihr Maximum, wenn die Glucose verbraucht ist; anschließend sinkt sie wieder ab. Bei dieser Bestimmung wurde allerdings unberücksichtigt gelassen, daß ein Teil des Äthanols infolge der starken Belüftung entweichen könnte; daher ist die Abnahme des Äthanols im Medium nach Verbrauch der Glucose noch kein ausreichender Beweis für seine Aufnahme durch die Zellen. Ein solcher Beweis läßt sich aber mit den folgenden Berechnungen erbringen: Aus Tabelle 1 (Mittel

aus mehreren Versuchen) geht hervor, 1. daß in der 2.Verzögerungsphase nach vollständigem Glucoseverbrauch 64% der eingesetzten Glucose zu Äthanol vergoren in der Kulturflüssigkeit vorliegen; 2. entspricht die Sauerstoffaufnahme der Zellen in der 1.Vermehrungsphase nach Warburgmessungen einer vollständigen Oxidation von mindestens 3% der eingesetzten Glucose; 3. kann aus der Trockengewichtszunahme von 1,4 mg/ml Nährlösung die hierzu verbrauchte Glucosemenge wie folgt berechnet werden: Nach BATTLEY (1960) haben aerob auf Glucose gewachsene Hefezellen aus der exponentiellen Wachstumsphase einen Kohlenstoffgehalt von 46,68% des Trockengewichtes; legt man diesen Wert zugrunde, so ergibt sich für die gefundene Trockengewichtszunahme ein Verbrauch von 18% der gesamten Glucose. Damit werden also in der 2.Verzögerungsphase 85% der eingesetzten Glucose wiedergefunden. Die fehlenden 15% Glucose könnten z.T. als Äthanol durch die Belüftung verlorengegangen sein, z.T. in Form anderer bei der Gärung entstandener Nebenprodukte ins Medium abgegeben worden sein. So fand BATTLEY außer Äthanol vor allem Glycerin und Glycerinphosphat, zeigte jedoch, daß diese unter ähnlichen Bedingungen zwar oxidiert, nicht aber zum Wachstum verwendet werden. In keinem Falle läßt sich eine Verdoppelung des Trockengewichtes in der 2.Vermehrungsphase auf solche aus dem Restbetrag der fehlenden Glucose entstandene C-Körper zurückführen.

Wenn nach diesen Berechnungen fast ausschließlich Äthanol als C-Quelle während der 2.Vermehrungsphase in Frage kommt, so bleibt noch nachzuweisen, daß Hefen aus der 2.Verzögerungsphase tatsächlich fähig sind, Äthanol zum Wachstum zu verwenden. Dazu wurde der folgende Versuch durchgeführt: Werden Zellen nach Verbrauch der Glucose in neue, jedoch glucosefreie Nährlösung umgesetzt, so vermehren sie sich nicht mehr und nehmen auch nicht an Trockengewicht zu; in Gegenwart von 3,5 mg Äthanol/ml (entsprechend der bei der Glucosefermentation freigewordenen Äthanolmenge, s. Tab.1) setzt erneute Zellvermehrung ein, die in Zunahme von Zellzahl und Trockengewicht den Verhältnissen in der 2.Vermehrungsphase einer normalen Kultur entspricht (Tab.2 u. Abb.6).

Tabelle 1.
Vergleich von eingesetzter Glucosemenge mit der Summe des Glucose-Verbrauches, berechnet aus a) Atmungs-O_2, b) Äthanolkonzentration sowie c) Trockengewichtszunahme. (Weitere Erläuterungen s. im Text)

	Beginn der Kultur	2.Verzögerungsphase nach vollständigem Glucoseverbrauch
mg Glucose/ml Nl	10,0	--
ml Äthanol/ml Nl (gemessen)	--	3,3
mg Glucose als Äthanol ausgeschieden 1)	--	6,4
mg Glucose/ml Nl insgesamt veratmet	--	0,3
mg Glucose/ml als Trockengewicht	--	1,8
Summe der wiedergefundenen Glucose, mg/ml	--	8,5

1) berechnet aus Gärungsgleichung (GAY-LUSSAC)

Auch dieser Versuch spricht also dafür, daß die C-Quelle in dieser Phase zum größten Teil oder ausschließlich Äthanol ist.

Tabelle 2.

Wachstum auf Äthanol.

	Beginn der Kultur		stationäre Phase	TG-Zunahme,
	mg Äthanol/ml	mg TG/ml	mg TG/ml	mg/ml
normale Kultur nach Verbrauch der Glucose	3,3	1,4	2,7	1,3
glucosefreie Nl + Äthanol (vergl. Abb.6)	3,5	1,1	2,8	1,7

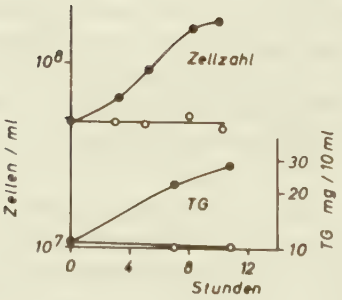

Abb.6. Zellvermehrung und Wachstum nach Umsetzen von Zellen aus der 2.Verzögerungsphase in glucosefreie Nährlösung. Ausgefüllte Kreise: Zusatz von 3,5 mg Äthanol/ml als C-Quelle, offene Kreise: ohne C-Quelle.

Zusammenfassend läßt sich feststellen: Die unter den verwendeten Bedingungen erhaltene Kurve der Zellvermehrung gliedert sich in fünf deutlich unterscheidbare Phasen:

Phase 1: 1.Verzögerungsphase,
" 2: 1.(exponentiell verlaufende) Vermehrungsphase,
" 3: 2.Verzögerungsphase,
" 4: 2.(nicht immer exponentiell verlaufende) Vermehrungsphase,
" 5: stationäre Phase.

In Phase 2 werden Wachstum und Zellvermehrung vorwiegend durch Fermentation und Assimilation von Glucose ermöglicht, in Phase 4 dagegen durch die Oxidation und Assimilation des bei der Glucosefermentation in die Kulturflüssigkeit ausgeschiedenen Äthanols.

In der Literatur ist ein solcher Kurvenverlauf für die Zellvermehrung der Hefen nur selten beschrieben worden. RICHARDS (1934) fand in einem Glucose-Wachstums-Medium für Saccharomyces cerevisiae eine "dicyclische" Zellvermehrung; der 2.Vermehrungs"cyclus" führte trotz fast erschöpfter Glucosemenge (nur noch ca. 7% der Anfangskonzentration zu Beginn des 2.Vermehrungscyclus) und trotz weiteren Anstieges des Äthanolgehaltes in der Nährlösung zu einer Zellvermehrung von 62% des 1.Vermehrungscyclus. Das Ende des 1.Vermehrungscyclus wird mit Anhäufung toxischer Stoffwechselprodukte in der Nährlösung gedeutet, die Latenzzeit vor Beginn des 2.Vermehrungscyclus damit, daß ein Teil der Zellen gegenüber diesen toxischen Stoffen resistent wird. Die Zellvermehrung im 2.Vermehrungscyclus wird auf neues Nahrungsangebot durch autolysierte Zellen zurückgeführt. Der von RICHARDS dargestellte Kurvenverlauf der Zellvermehrung stimmt mit den eigenen Ergebnissen gut überein. Im Kurvenverlauf des Wachstums (gemessen als Trockengewicht/Volumen) dagegen ergeben sich Widersprüche: Während RICHARDS für den 2.Vermehrungscyclus trotz ansteigender Zellzahl einen Abfall des Trockengewichtes angibt, konnte in den eigenen Untersuchungen stets nur ein der Zellvermehrung annähernd paralleler Anstieg gefunden werden (15 Versuche). Dadurch wird die Interpretation der von RICHARDS erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Verwendung von Äthanol problematisch; da jedoch

in den von ihm angegebenen Kurven noch vor Ende des 2.Vermehrungscyclus nach vorherigem Anstieg ein Abfall der Äthanolkonzentration im Medium erfolgt, ist zu vermuten, daß auch in diesen Versuchen Äthanol als Substrat für die weitere Zellvermehrung verantwortlich ist, und nicht ausschließlich autolysierte Zellen.

HABOUCHA und MASSCHELEIN (1960) untersuchten das aerobe Wachstum von Saccharomyces cerevisiae, S. carlsbergensis und einer atmungsdefekten Mutanten von S. cerevisiae in einem Glucose-Wachstumsmedium: Die atmungsdefekte Mutante stellte nach Verbrauch der Glucose ihr Wachstum ein, bei S. carlsbergensis erfolgte eine exponentielle Vermehrungsphase auf Glucose und nach einer Adaptationsphase eine weitere exponentielle Vermehrungsphase mit dem zuvor gebildeten Äthanol als Substrat. S. cerevisiae dagegen benutzte nach Verbrauch der Glucose das dabei entstandene Äthanol zum weiteren Wachstum ohne vorherige Adaptation. Das Phänomen der "Diauxie" bei S. carlsbergensis ließ sich auf eine weitgehende Blockierung des Tricarbonsäurecyclus auf der Stufe der Bernsteinsäuredehydrogenase während des Wachstums auf Glucose zurückführen, dagegen war die Isocitronensäuredehydrogenaseaktivität nur erniedrigt, was auf ein teilweises Funktionieren des Cyclus vor der Adaptation schließen ließ. Die in den eigenen Versuchen gefundene, in zwei Phasen erfolgende Zellvermehrung, die Dauer der sie trennenden Verzögerungsphase sowie die Unterschiede in der anfänglichen Atmungsintensität nach Umsetzen der Zellen aus verschiedenen Phasen der Vorkultur in ein Acetatmedium (s.S.29) deuten darauf hin, daß der hier verwendete Hefestamm die Fähigkeit zum Wachstum auf Äthanol und Acetat ebenfalls erst am Ende des Glucosemetabolismus adaptiv erwirbt.

b) Die Sporulation in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Entnahme aus der Vorkultur.

Als nächstes sollten nun die in der Vorkultur ermittelten Veränderungen in Beziehung gesetzt werden zur Sporulation, d.h. es war die Frage zu untersuchen: Ist die Fähigkeit zur Ascosporenbildung unterschiedlich bei Zellen, die aus verschiedenen, im vorigen Abschnitt charakterisierten Phasen der Vorkultur entnommen und in das Sporulationsmedium übertragen wurden?

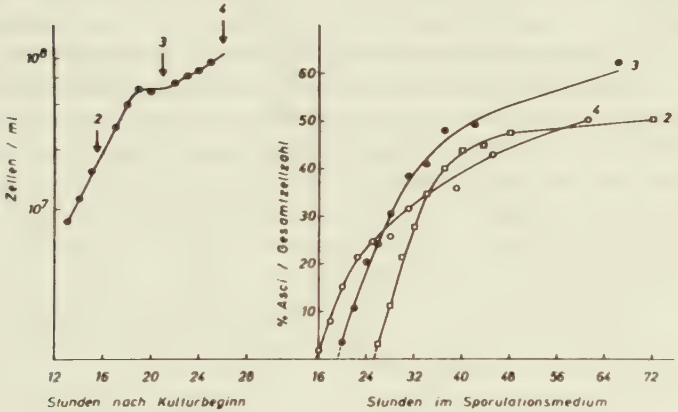

Abb.7. Sporulation von Zellen aus verschiedenen Phasen der Vorkultur. Links: Vorkultur (die Pfeile geben die Zeitpunkte der Entnahmen an), rechts: Sporulation.
2: Zellen aus der 1.Vermehrungsphase (Phase 2);
3: Zellen aus der 2.Verzögerungsphase (Phase 3);
4: Zellen aus der 2.Vermehrungsphase (Phase 4).

In Abb.7 ist die Zellvermehrung in der Vorkultur mit den Zeitpunkten der Entnahmen für die Sporulationskulturen wiedergegeben sowie der zeitliche Verlauf der Sporenbildung dieser Zellen. Die Hefen wurden entnommen 1. aus der 1.Ver-

mehrungsphase zu der Zeit, während der die Nährlösung noch etwa die Hälfte der Glucose enthielt und die O_2-Aufnahme der Zellen noch gering war (Phase 2), 2. aus der 2.Verzögerungsphase nach Verbrauch der Glucose in der Nährlösung (Phase 3) und 3. aus der 2.Vermehrungsphase zur Zeit stärkster Atmung der Zellen (Phase 4). Die Sporulationskurven zeigen, daß Zellen aus Phase 2 die ersten sichtbaren Asci 25 Std. nach Umsetzen ins Sporulationsmedium aufweisen, diejenigen aus Phase 3 nach 19 Std. und diejenigen aus Phase 4 bereits nach 15 Std. Demgegenüber ist jedoch die Sporulationsrate, d.h. die pro Zeiteinheit gebildete Zahl von Asci, für Zellen aus Phase 2 und 3 insgesamt größer als für Zellen aus Phase 4 (Abb.8), so daß aus Phase 2 entnommene Zellen die kürzeste Zeit für die Sporenbildung benötigen und diejenigen aus Phase 4 die längste. Weiterhin zeigen die Sporulationsraten, daß das Maximum der Sporenbildung/Zeiteinheit für Zellen aus Phase 3 und 4 zu Beginn der Sporenbildung liegen muß, während es für Zellen aus Phase 2 3-5 Std. nach Beginn sichtbarer Sporenbildung liegt.

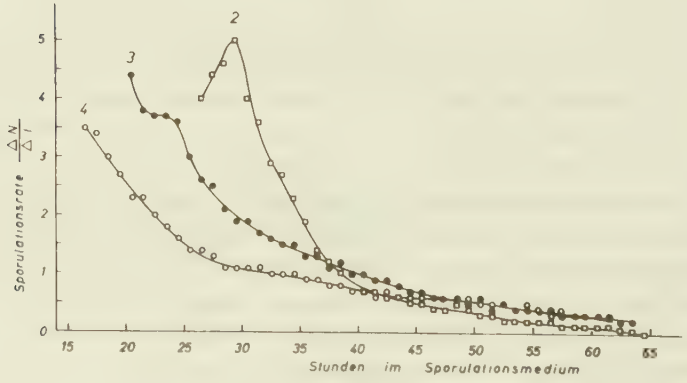

Abb.8. Sporulationsraten (Zahl der Asci/Zeiteinheit) für die in Abb.7 dargestellten Sporulationskurven.
N = % Asci/Gesamtzellzahl.

Zur Zeit der letzten Zählwerte (60-70 Std. nach Beginn der Sporulationskultur) ist die Sporenbildung für Zellen aus den Phasen 3 und 4 wahrscheinlich noch nicht ganz abgeschlossen; da sich jedoch bei zu langer Kulturdauer das Verhältnis der Asci zur Gesamtzahl der Zellen durch Absterben vegetativer Zellen zugunsten der Asci verschieben kann (bereits in 2-3 Tage alten Kulturen werden zuweilen sich auflösende vegetative Zellen gefunden, außerdem erhält man durch Zellzahlbestimmung in der THOMA-Zählkammer zu dieser Zeit z.B. nur noch 13,5-14,0 x 10^6 Zellen gegenüber 14,4 x 10^6 Zellen nach einem Tag), wurden die Sporulationskulturen nicht bis zu ihrem Ende verfolgt, sondern meist nach 2 1/2-3 Tagen abgebrochen.

Das Auftreten der ersten zählbaren Asci kann sich zwar von Versuch zu Versuch um ± 1-2 Std. verschieben, jedoch sind bei jedem Versuch die Unterschiede im Sporulationsbeginn für Zellen aus den einzelnen Phasen reproduzierbar, d.h. Zellen aus der 2.Verzögerungsphase beginnen etwa 3-4 Std. später, Zellen aus der 1.Vermehrungsphase etwa 10 Std. später mit der Sporulation als Zellen aus der 2.Vermehrungsphase. Das zeigen 2 weitere Versuche in Tabelle 3, bei denen aus den Sporulationskurven die Zeiten ermittelt wurden, zu denen 3-5% Asci gebildet worden waren.

Tabelle 3.

Abhängigkeit des Sporulationsbeginnes vom Zeitpunkt der Entmahme aus der Vorkultur.

	Std. im Sporulationsmedium bis zur Bildung von 3-5% Asci/Gesamtzellzahl		
	1.Vermehrungsphase	2.Verzögerungsphase	2.Vermehrungsphase
Versuch 1	26 1/2	20 1/2	17
Versuch 2	28	22	18 1/2

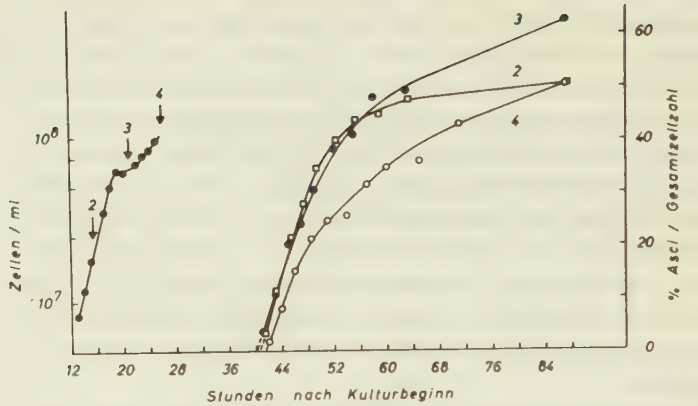

Abb.9. Sporulation von Zellen aus verschiedenen Phasen der Vorkultur (vergl. Abb.7). Die Abszisse gibt die Stunden nach Beginn der Vorkultur an, die Pfeile die Entnahme der Zellen aus der Vorkultur und zugleich den Beginn der entsprechenden Sporulationskultur.

Diese zuvor aufgezeigten Unterschiede im Sporulationsbeginn verschwinden jedoch, wenn zu der Dauer der Sporulationskultur noch die Zeit der Vorkultur gerechnet wird. Diejenigen Zellen, die zu einem früheren Zeitpunkt aus der Vorkultur entnommen wurden, benötigen eine entsprechend längere Zeit in der Sporulationskultur, um zur Sporenbildung zu gelangen, als solche aus einem späteren Abschnitt der Vorkultur (Abb.9). Daraus kann man schließen, daß einige der für die Sporulation notwendigen Prozesse bereits in der Vorkultur ablaufen können, aber nur selten a l l e diese Prozesse, da die Hefen in der Vorkultur selbst nur gelegentlich und dann erst nach langer Zeit und zu einem äußerst geringen Prozentsatz sporulieren.

Nach diesen Ergebnissen wurde geprüft, ob sich neben den Unterschieden im Sporulationsbeginn und in der Sporulationsrate auch solche in der Zahl und Verteilung der Asci ergeben. Bekanntlich enthalten bei Saccharomyces cerevisiae

nicht alle Asci konstant 4 Ascosporen, sondern deren Zahl kann bis auf eins reduziert sein. FOWELL und LOORSE (1960) wiesen durch Einzellisolierung nach, daß Hefekulturen die Tendenz haben, in Zelltypen mit unterschiedlicher Sporulationsfähigkeit und unterschiedlichem und charakteristischem prozentualen Anteil an Asci mit 1, 2, 3 und 4 Ascosporen an der Gesamtzahl der Asci aufzuspalten. Allerdings veränderte sich diese Verteilung der Asci von Medium zu Medium. Die Zahl der Sporen im Ascus wird also außer von genetischen auch durch chemische Faktoren beeinflußt. Im vorigen Kapitel ist deutlich geworden, daß sich das Nährmedium im Verlauf der Vorkultur stark verändert (s. C-Quelle, pH-Wert). Infolgedessen war zu erwarten, daß bei der Sporulation von Zellen aus den verschiedenen Phasen der Vorkultur auch Verschiebungen im prozentualen Anteil der 1-, 2-, 3- und 4-sporigen Asci eintreten würden. Die Bestätigung dafür zeigt Tabelle 4, in welcher für 2 der zuvor beschriebenen Versuche a) der Anteil der Asci an der Gesamtzahl der Zellen und b) die prozentuale Verteilung der Asci nach der Zahl ihrer Sporen zur Zeit der letzten Zählung (60-70 Std. nach Übertragung in das Sporulationsmedium) und der Meßfehler in Form der Standardabweichung $S_{\bar{x}}$ angegeben sind: Phase 3 unterscheidet sich von den Phasen 2 und 4 durch einen signifikant höheren Anteil an 4-sporigen Asci und an Asci insgesamt, bezogen auf die Gesamtzellzahl (s. linke Hälfte der Tabelle 4, vergl. auch Abb.9). Daraus ergibt sich, daß Zellen aus der 2.Verzögerungsphase offenbar die besten Voraussetzungen für eine gute Sporulation haben. Möglicherweise hängt dies auch damit zusammen, daß diese Zellen zur Zeit ihrer Entnahme aus der Vorkultur das höchste Trockengewicht/Zelle besitzen (s. Abb.5) und damit offenbar die meisten endogenen Reserven. Außerdem liegen in der 2.Verzögerungsphase überwiegend Einzelzellen vor, und neue Sproßzellen werden kaum angelegt, während in der 1. und 2.Vermehrungsphase der größte Teil der ausgewachsenen Zellen eine oder mehrere junge Sproßzellen trägt, so daß letztere vielleicht als "vegetativer" bezeichnet werden können. Eine Parallele dazu könnte die bei höheren Pflanzen häufig beobachtete Erscheinung sein, daß üppiges vegetatives

Tabelle 4. Vergleich des Anteiles 1-, 2-, 3- und 4-sporiger Asci von Zellen aus der 1.Vermehrungsphase (Phase II), 2.Verzögerungsphase (Phase III) und 2.Vermehrungsphase (Phase IV) zur Zeit der letzten Zählung (60-70 Std. nach Übertragung in das Sporulationsmedium) am Beispiel von 2 Versuchen.

% Asci: Mittel aus 5 Einzel-Zählwerten;
$S_{\bar{x}}$: Standardabweichung; FG: Freiheitsgrade; *: signifikanter Unterschied ($p \leq 0{,}01$).

Versuch Nr.	Zellen aus Phase		% Asci pro Gesamt-Zellzahl Zahl der Sporen im Ascus					% Asci pro Gesamt-Asci Zahl der Sporen im Ascus			
			1	2	3	4	Gesamt-Asci	1	2	3	4
1	II	% Asci	0,7	5,9	12,1	31,9	50,6	1,4	11,6	23,9	63,0
		$S_{\bar{x}}$	0,75	1,35	2,78	0,66	4,19	1,56	2,40	3,78	4,76
	III	% Asci	1,1	6,7	11,9	42,8	62,5	1,8	10,7	19,1	68,5
		$S_{\bar{x}}$	0,58	0,98	1,99	3,96	3,80	0,82	1,52	3,65	3,52
	IV	% Asci	0,9	8,7	14,3	26,5	50,4	1,8	17,2	28,4	52,7
		$S_{\bar{x}}$	0,37	1,40	1,66	1,65	4,25	0,6	1,72	1,89	2,19
	p FG = 8	II-III	0,43	0,37	0,92	0,00350 *	0,0029 *	0,66	0,55	0,093	0,084
		II-IV	0,65	0,021	0,21	0,036	0,948	0,65	0,0052 *	0,025	0,0045 *
		III-IV	0,58	0,047	0,10	< 0,0002 *	0,0028 *	1,0	0,00045 *	0,0022 *	< 0,0002 *
2	II	% Asci	0,6	5,7	11,5	35,9	53,7	1,1	10,6	21,4	66,9
		$S_{\bar{x}}$	0,37	1,87	1,18	2,85	2,73	0,69	3,24	2.66	2,80
	III	% Asci	1,0	7,7	9,7	44,0	62,4	1,6	12,4	15,5	70,5
		$S_{\bar{x}}$	0,55	1,44	1,60	2,86	1,94	0,84	2,42	2,54	4,10
	IV	% Asci	1,2	9,1	12,5	28,9	51,7	2,3	17,6	24,2	55,8
		$S_{\bar{x}}$	0,40	1,02	1,10	3,06	3,00	0,71	2,75	2,12	2,58
	p FG = 8	II-III	0,26	0,12	0,10	0,004 *	0,0008 *	0,39	0,41	0,012	0,18
		II-IV	0,06	0,012	0,24	0,011	0,37	0,43	0,011	0,138	0,0005 *
		III-IV	0,58	0,145	0,020	< 0,0002 *	0,0004 *	0,24	0,022	0,00075 *	0,0003 *

Wachstum Blütenbildung ausschließt oder zumindest verzögert.

Betrachtet man die prozentuale Aufteilung der Asci auf 2-, 3- und 4-sporige Asci (s. rechte Hälfte der Tabelle 4), so besteht ein gesicherter Unterschied zwischen Phase 3 und 4, und zwar sind bei Zellen aus Phase 4 die 4-sporigen Asci wesentlich erniedrigt, die 2- und 3-sporigen Asci dagegen erhöht. Ebenso liegen in Phase 2 gegenüber Phase 4 die 4-sporigen Asci signifikant höher. Dagegen besteht hier kein gesicherter Unterschied zwischen Phase 2 und 3.

Wie lassen sich nun diese für die verschiedenen Phasen erhaltenen unterschiedlichen Sporulationsergebnisse erklären? Die schlechtere Sporulation von Zellen aus Phase 4 ließe sich vielleicht auf eine Verarmung der Nährlösung an einem oder mehreren für die Sporulation notwendigen Stoffen zurückführen, wodurch dann auch die Zellen der Phase 4 an den fraglichen Stoffen verarmt sein müßten. Um diese Annahme zu prüfen, wurde ein Versuch aufgrund folgender Überlegung durchgeführt: Bei Erniedrigung der Konzentration der C-Quelle (Glucose) würden wegen des geringeren Wachstums infolge schnellerer Erschöpfung der C-Quelle die übrigen Substanzen zur Zeit der 2.Vermehrungsphase noch reichlicher vorhanden sein als bei der normalen Nährlösung. Daher könnten die in dieser Phase gebildeten Zellen nun reichlicher mit diesen Stoffen (z.B. Aminosäuren, Wuchsstoffe, Spurenelemente) versorgt sein. Wenn obige Überlegung stimmt, so müßten solche Zellen dann eine höhere Sporulation haben und mehr 4-sporige Asci ausbilden. Es wurde eine Kultur mit halber Glucosekonzentration in sonst gleicher Nährlösung angesetzt, wodurch die Zellvermehrung auf etwa die Hälfte herabgesetzt war, der Kurvenverlauf aber der gleiche blieb. Die bei der Sporulation von Zellen aus dieser 2.Vermehrungsphase erhaltenen Ergebnisse unterscheiden sich jedoch nicht von denen der anderen Versuche (Tabelle 5 unten); daher kann eine schlechtere Sporulation von Zellen aus der 2.Vermehrungsphase nicht Folge eines Mangels an spezifischen Nährstoffen in der Kulturflüssigkeit sein.

Eine andere Deutungsmöglichkeit besteht darin, daß Äthanol und Acetat - zumindest in der verwendeten Nährlösung und

Tabelle 5.
Vergleich der Sporulation von Zellen aus einer normalen Vorkultur mit der von Zellen aus einer Vorkultur mit halber Glucosekonzentration.

	Phase	% Asci/Gesamtzellzahl	% Asci/ Gesamtasci			
			1-sp.	2-sp.	3-sp.	4-sp.
normale Glucose-Konz. (1%) Mittel aus den 2 Versuchen in Tab.4	2	52,2	1,3	11,1	22,7	65,0
	3	62,5	1,7	11,6	17,3	69,5
	4	51,1	2,1	17,4	26,3	54,3
halbe Glucose-Konz. (0,5%)	4	50,8	1,8	16,1	27,0	55,1

für unseren Hefestamm - während des vegetativen Wachstums keine ausreichenden C-Quellen sind für die Synthese aller notwendigen bzw. für die nachfolgende Sporulation notwendigen zelleigenen Substanzen. Für eine derartige Überlegung sprechen z.B. die Untersuchungen von GILVARG und BLOCH (1951), die ergaben, daß bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glucose und Acetat die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Glycin nur aus Glucose, nicht aber aus Acetat synthetisiert wurden, während 80% des Lysins aus Acetat gebildet wurden. In die gleiche Richtung weist ein nur einmal durchgeführter Versuch, bei dem die 2.Vermehrungsphase gewissermaßen verlängert wurde, und zwar dadurch, daß Zellen aus der späten 2.Vermehrungsphase in neue vollständige Nährlösung mit Acetat als einziger C-Quelle überführt und dann aus der neuen logarithmischen Wachstumsphase umgesetzt wurden: Die Zahl der insgesamt gebildeten Asci betrug gegenüber der von Zellen aus der 2.Vermehrungsphase einer normalen Kultur nur noch 77%, der Anteil der 4-sporigen Asci an der Zahl der gesamten Asci nur noch 75%, d.h. der Effekt der 2.Vermeh-

rungsphase wurde noch verstärkt.

Weiterhin wäre es möglich, daß in Abwesenheit von Glucose bestimmte Stoffe nicht in die Zellen aufgenommen werden. Z.B. soll die Phosphataufnahme bei Hefen spezifisch an glycolytische Reaktionen gekoppelt, dagegen während des Äthanol-, Acetat-, Pyruvat- und Lactat-Metabolismus sehr gering sein (GOODMAN und ROTHSTEIN 1954). Das Gleiche wurde von HOTCHKISS (1943) für Staphylococcus gefunden.

Es wäre jedoch auch denkbar, daß es sich bei dem verwendeten Hefestamm um ein Gemisch aus Zelltypen bzw. Klonen mit unterschiedlichen Sporulationseigenschaften handelt (FOWELL und MOORSE 1960, vergl. S.25), die sich auch in ihrem Stoffwechsel unterscheiden, so daß im Verlauf der Vorkultur einzelne Klone gefördert bzw. gehemmt werden, woraus dann ebenfalls Unterschiede in der Sporulation von Zellen aus den verschiedenen Vorkulturphasen resultieren müßten. Ein Beispiel dafür sind die in jeder Kultur auftretenden atmungsdefekten Mutanten [1]; in dieser Kultur müßte ihre Vermehrungsfähigkeit in der 2.Vermehrungsphase durch den Verbrauch der Glucose begrenzt sein.

Nach Untersuchungen von EATON und KLEIN (1954) können Hefen aus der frühen logarithmischen Wachstumsphase nur sehr langsam Äthanol und Acetat oxidieren, während Zellen aus der frühen stationären Phase Äthanol und Acetat sofort oxidieren. Die Fähigkeit zur Acetatoxidation soll erst im Verlauf der Glucoseoxidation adaptiv gebildet werden (EATON und KLEIN 1957). Da bei den beschriebenen Versuchen die Sporulation von Zellen aus der ersten Vermehrungsphase etwa 10 Std. später einsetzt als von Zellen aus der 2.Vermehrungsphase, und da für erstere in der Vorkultur die C-Quelle Glucose, für letztere Äthanol ist, lag die Vermutung nahe, daß die Fähigkeit der Zellen zur Oxidation von Acetat für die unterschiedlich lange Zeit vom Umsetzen in das Sporulationsmedium (Acetat als C-Quelle!) bis zum Sporulationsbeginn zumindest mit

---

[1] Sie wurden mit dem TTC-Test nach OGUR, JOHN und NAGAI (1957) nachgewiesen, und ihr Anteil war z.B. in einem Versuch in der frühen 1.Vermehrungsphase 9,6%, in der 2.Vermehrungsphase nur noch 0,8%.

verantwortlich ist. Eine verschieden gute Adaptation an Acetat bei Zellen aus den verschiedenen Phasen der Vorkultur müßte sich in Unterschieden der Anfangsrate der Atmung im Sporulationsmedium zeigen.

Im Verlauf der Vorkultur wurden zu den in Abb.10 a) angegebenen Zeiten Zellen entnommen und ihre O_2-Aufnahme während der ersten 3 Std. im Sporulationsmedium gemessen [1]. Wie Abb.10 b) zeigt, haben Zellen aus der späten 1.Vermehrungsphase eine sehr geringe O_2-Aufnahme, bei Zellen aus der 2.Verzögerungsphase ist sie erheblich größer und am höchsten bei Zellen aus der 2.Vermehrungsphase. Zellen aus der stationären Phase haben dann wieder eine geringere Atmungsintensität, ungefähr gleich derjenigen von Zellen aus der 2.Verzögerungsphase. Die O_2-Aufnahme von Zellen aus der frühen 1.Vermehrungsphase ist so niedrig, daß die erhaltenen Werte (0,003 μ Mole O_2/120 min. x 10^7 Zellen) innerhalb der Fehlergrenze der Meßmethode lagen.

Da die Möglichkeit bestand, daß bei der Messung der O_2-Aufnahme im Sporulationsmedium auch eine endogene Atmung mit erfaßt worden war, wurde gleichzeitig die Atmung der Zellen in Phosphatpuffer allein bestimmt: Sie ist am größten für Zellen aus der 2.Verzögerungsphase (0,18 μ Mole O_2/120 min. x 10^7 Zellen), und am geringsten für Zellen aus der stationären Phase (0,014 μ Mole). Zellen aus der frühen 1.Vermehrungsphase haben zwar eine geringe endogene Atmung (0,06 μ Mole O_2), doch ist diese um etwa das 20-fache höher als im Acetatmedium. Die Hefen verhalten sich also im gepufferten Acetatmedium anders als im Puffer allein, und man darf annehmen, daß die endogene Atmung bei den oben dargestellten Meßergebnissen der Atmung im Acetatmedium nicht wesentlich beteiligt ist.

---

1) Die Zellen wurden abzentrifugiert, einmal in Phosphatpuffer (pH 6,0) gewaschen, in Puffer suspendiert und nach Einstellen der Zelldichte in die Warburggefäße pipettiert. Nach Eintemperieren wurde aus der Seitenbirne Acetat zugegeben und mit den Ablesungen begonnen. (Zelldichte, Acetatkonzentration und Puffer wie in allen anderen Sporulationsversuchen, 10%ige KOH im Mitteleinsatz der Gefäße.)

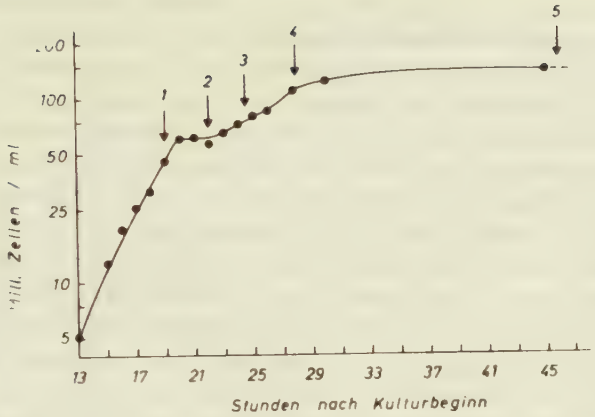

Abb.10 a). Zellvermehrung in der Vorkultur. Die Pfeile geben die Entnahmezeiten für die Atmungsversuche an (s. Abb.10b).

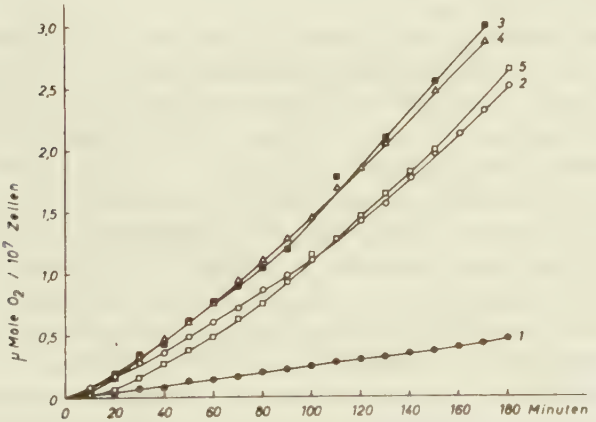

Abb.10 b). Atmung von Zellen aus verschiedenen Phasen der Vorkultur nach Umsetzen ins Sporulationsmedium. 1: späte 1.Vermehrungsphase; 2: 2.Verzögerungsphase; 3, 4: 2.Vermehrungsphase; 5: stationäre Phase.

Demnach besitzen zu Beginn der Sporulationskultur diejenigen Zellen die höchste Atmungsintensität, die auch am frühesten mit der Sporenbildung beginnen. Daher schien eine Korrelation zwischen der Fähigkeit zur Acetatoxidation und dem Sporulationsbeginn zu bestehen. Um dies noch genauer zu prüfen, wurde die O_2-Aufnahme der Zellen aus der 1. und 2. Vermehrungsphase im gesamten Verlauf der Sporulationskultur bestimmt, und zwar wurden die Zellen anfangs alle 2 Std., später in größeren Abständen direkt in Warburggefäße übertragen und ihre O_2-Aufnahme 1 Std. lang gemessen (Abb.11). Der Vergleich der beiden Kurven ergibt, daß die früher mit der Sporulation beginnenden Zellen aus der 2.Vermehrungsphase auch das Maximum der O_2-Aufnahme früher erreichen; insgesamt ist ihre Atmungsintensität allerdings geringer als bei denjenigen aus der 1.Vermehrungsphase. Zur Erklärung eines um etwa 10 Std. verzögerten Sporulationsbeginnes für diese letzteren Zellen gegenüber ersteren kann eine zeitliche Differenz von etwa 2 Std. für die Maxima der O_2-Aufnahme jedoch nicht ausreichen.

Beide Kurven der O_2-Aufnahme haben nach anfänglichem Maximum und anschließendem Plateau etwa zur Zeit beginnender Sporenbildung einen starken Abfall. Der Beginn dieses Atmungsabfalles fällt zeitlich zusammen mit dem Ende der Trokkengewichtszunahme in der Kultur (Abb.12). Da nun dieser Zeitpunkt für Zellen aus der 2.Vermehrungsphase etwa 10 Std. früher liegt als für Zellen aus der 1.Vermehrungsphase, ergibt sich wohl eine Korrelation zwischen Dauer hoher bis mittlerer Atmungsintensität sowie Dauer der Zellsubstanzzunahme einerseits und dem Sporulationsbeginn andererseits; dagegen erfolgt die Acetatadaptation der Zellen aus der 1. Vermehrungsphase, wie sich aus der Atmungsintensität ergibt, nur mit geringer Verzögerung und scheint daher den Sporulationsbeginn nur relativ geringfügig hinauszuzögern.

Die in Abb.11 und 12 dargestellten Versuchsdaten zeigen eine weitgehende Übereinstimmung mit den bei Bakterien gewonnenen Ergebnissen. Wie MILLER (1959) und MILLER und HOFFMANN-OSTENHOF (1964) ausführten, läßt sich die Sporulation der Hefen in einer Reihe wichtiger Faktoren mit der

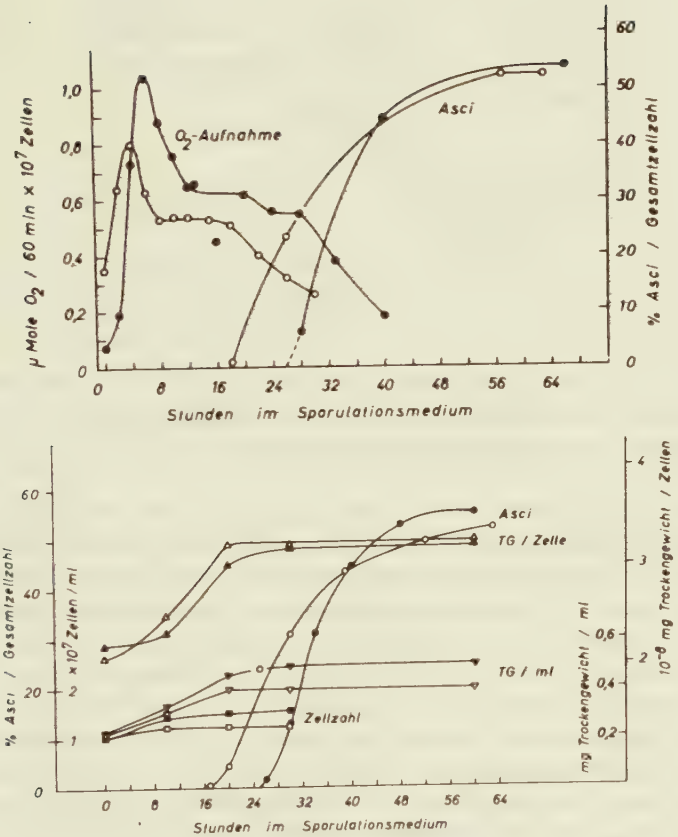

Abb.11 (oben). Sauerstoffaufnahme und Sporulation von Zellen aus der 1.Vermehrungsphase (geschlossene Symbole) und von Zellen aus der 2.Vermehrungsphase (offene Symbole).

Abb.12 (unten). Zellvermehrung, Trockengewicht (TG) und Sporulation von Zellen aus der 1.Vermehrungsphase (geschlossene Symbole) und von Zellen aus der 2.Vermehrungsphase (offene Symbole).

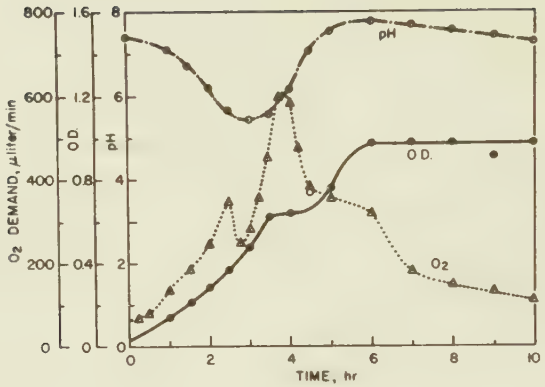

Abb.13. Sauerstoffaufnahme, optische Dichte (O.D.) und pH-Wert der Nährlösung in einer Kultur von Bacillus cereus Stamm T. (Aus NAKATA und HALVORSON 1960).

Sporulation aerober Bakterien vergleichen. Abb.13 (aus NAKATA und HALVORSON 1960) zeigt das Wachstum (optische Dichte), die O_2-Aufnahme der Zellen und den pH-Wert der Nährlösung einer zu vollständiger synchroner Sporulation führenden Bakterienkultur. Die Kurve der O_2-Aufnahme hat 2 Maxima: Das erste während der Zellvermehrung in der logarithmischen Wachstumsphase beruht auf unvollständiger Oxidation von Glucose, wodurch sich in der Nährlösung Acetat und Pyruvat anreichern. Die Bakterien verfügen in dieser vegetativen Phase noch nicht über alle zum vollständigen Abbau der Glucose notwendigen Enzyme (HANSON, SRINIVASAN und HALVORSON 1963); das gleiche gilt, wie auf S.20 und 29 ausgeführt, wahrscheinlich auch für die Hefen in dieser (1.Vermehrungs-) Phase. Das zweite Atmungsmaximum in der Bakterienkultur beruht auf Oxidation der in der Nährlösung angereicherten organischen Säuren, die Bakterien befinden sich hier bereits in der Sporulationsphase. Auch in der Bakterienkultur (vergl. Abb.12) sinkt die Atmung stärker ab, sobald das Trockengewicht (= optische Dichte) seinen Endwert erreicht hat. Die

ersten Sporen erscheinen 1 Std. nach diesem Zeitpunkt. Zu erwähnen ist noch, daß für Hefen (MILLER und HALPERN 1956) wie für Bakterien (HANSON, SRINIVASAN und HALVORSON 1963) in den Anfangsstadien der Sporulation der Tricarbonsäure-cyclus notwendig ist.

2. Der Einfluß sichtbaren Lichtes auf die Sporulation.

a) Belichtung der Sporulationskultur.

In Abschnitt 1 wurde ein deutlicher Einfluß der Vorkultur auf die Sporenbildung gefunden; dieser führt - wie die folgenden Untersuchungen zeigen - auch zu unterschiedlichen Wirkungen des Lichtes während der Sporulation.

α) Der Einfluß von Weißlicht.

Zunächst wurde der Lichteinfluß auf Zellen aus der 1.Vermehrungsphase untersucht. In Abb.14 ist für 3 Versuche der zeitliche Verlauf der Sporulation im Weißlicht von 2 x 10 000 Lux (2 x 350 kerg/cm^2 x sec.) und im Dunkeln dargestellt. Die Kurven lassen bereits in dieser Darstellung eine zweifache Lichtwirkung erkennen: 1. eine Verzögerung und 2. eine Hemmung der Sporenbildung. Noch deutlicher werden diese beiden Effekte in Abb.15, Kurve 1 (Mittel der Versuche aus Abb.14), in der die Sporenbildung im Licht in Prozent der Dunkelkontrolle aufgetragen ist. Die anfänglich sehr starke Hemmung der Ascusbildung im Licht beruht auf einer Verzögerung der Sporulation, die endgültige Hemmung

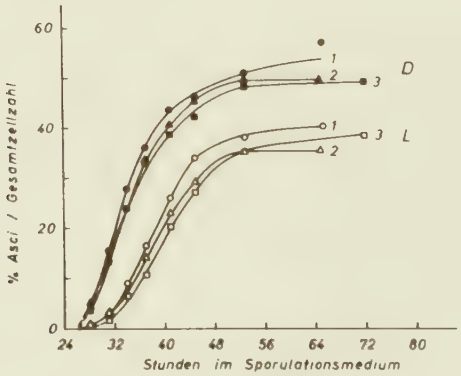

Abb.14. Sporulation von Zellen aus der 1.Vermehrungsphase im Weißlicht (L) von 2 x 10 000 Lux (= 2 x 350 kerg/cm^2 x sec.) und im Dunkeln (D). 1,2 u. 3: drei verschiedene Versuche.

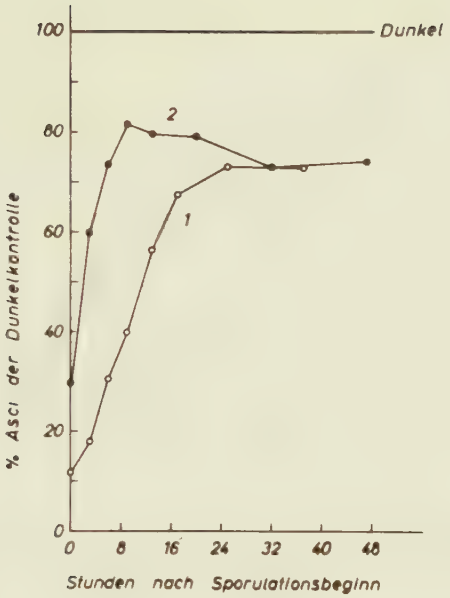

Abb.15. Sporulation im Weißlicht von 2 x 10 000 Lux von Zellen aus der 1.Vermehrungsphase (Kurve 1, offene Kreise) und von Zellen aus der 2.Vermehrungsphase (Kurve 2, geschlossene Kreise) in % der Dunkelkontrolle (Mittel der Versuche aus Abb.14 und 17).

liegt dann bei 70-80% der Dunkelkontrolle. Abb.16 zeigt die Sporulationsrate für Licht und Dunkelheit (Mittel der 3 Versuche): Das Maximum der Sporulationsrate, also das Zeitintervall, in dem die meisten Asci gebildet werden, liegt im Licht 7 Std. später als im Dunkeln.

Für Zellen aus der 2.Vermehrungsphase wurde im Weißlicht gleicher Intensität eine Hemmung der Sporulation gefunden, die der von Zellen aus der 1.Vermehrungsphase vergleichbar ist (Abb.17 und Abb.15, Kurve 2). Die Verzögerung der Sporulation ist dagegen geringer. Während die höchste Sporulationsrate für Zellen aus dieser Phase der Vorkultur

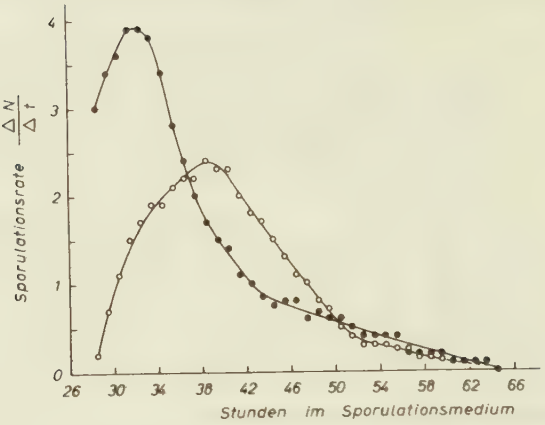

Abb.16. Sporulationsrate von Zellen aus der 1.Vermehrungsphase im Weißlicht (offene Kreise) und im Dunkeln (geschlossene Kreise); Mittel der 3 Versuche aus Abb.14. N = % Asci pro Gesamtzellzahl.

wahrscheinlich zu Beginn der Sporulation liegt (vergl. Abb.8, Kurve 4, S.22), liegt sie im Licht 4 Std. nach Beginn sichtbarer Sporenbildung (Abb.18). Es erfolgt also auch hier durch Belichtung eine Verzögerung des Zeitpunktes maximaler Sporenbildung.

Erwähnt sei noch, daß bei Versuchen mit Zellen aus der 1.Vermehrungsphase zuweilen eine sehr viel stärkere Verzögerung und Hemmung der Sporulation im Licht gefunden wurde (40% der Ascusbildung der Dunkelkontrolle bei 2 x 10 000 Lux). Ein solches Versuchsergebnis ist in Abb.19 dargestellt. Die Ursache für diese gelegentlich viel stärkere Lichtsensibilität der Zellen war bisher nicht festzustellen. Abb.19 zeigt weiterhin, daß die Hemmung der Ascusbildung mit zunehmender Beleuchtungsstärke ansteigt (bei 2 x 20 000 Lux Rückgang der Asci bis auf 5% der Dunkelkontrolle).

Weiterhin wurde untersucht, ob das Licht auch die Zahl der pro Ascus gebildeten Sporen beeinflußt. In Abb.20 sind

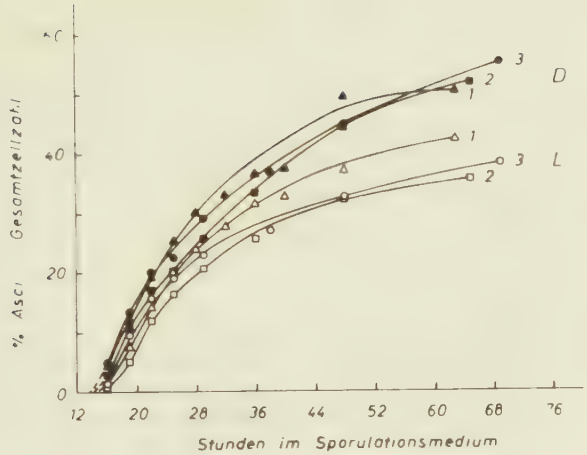

Abb.17. Sporulation von Zellen aus der 2.Vermehrungsphase im Weißlicht (L) von 2 x 10 000 Lux und im Dunkeln (D). 1, 2 u. 3: drei verschiedene Versuche.

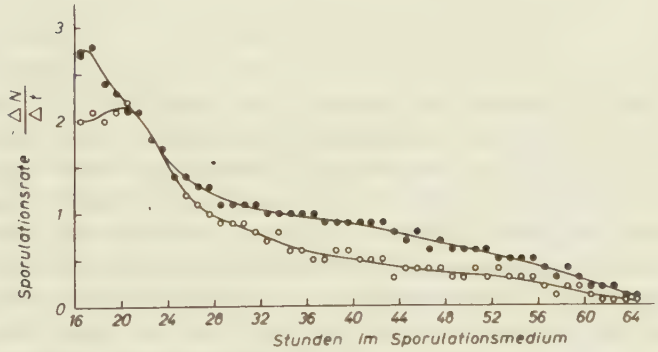

Abb.18. Sporulationsrate von Zellen aus der 2.Vermehrungsphase im Weißlicht (offene Kreise) und im Dunkeln (geschlossene Kreise); Mittel der Versuche aus Abb.17.

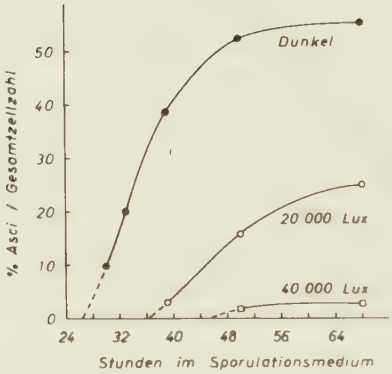

Abb.19. Sporulation von Zellen aus der 1.Vermehrungsphase im Weißlicht von 2 x 10 000 Lux (= 2 x 350 kerg/cm^2 x sec.) und 2 x 20 000 Lux (= 2 x670 kerg/cm^2 x sec.) und im Dunkeln.

für den Verlauf der Sporulation die Asci mit 1, 2, 3 und 4 Ascosporen in Prozent der gesamten Asci aufgetragen, a) für Zellen aus der 1.Vermehrungsphase (Mittel der 3 Versuche in Abb.14) und b) für Zellen aus der 2.Vermehrungsphase (Mittel der 3 Versuche in Abb.17). Zunächst wird in beiden Abbildungen ein Abfall des Anteiles der 4-sporigen Asci an der gesamten Ascuszahl im Verlauf der Sporulation deutlich. Auch wenn zu Beginn der Sporulation infolge der geringen Zahl der Asci insgesamt der Zählfehler noch sehr groß ist, ergibt sich doch daraus, daß die 4-sporigen Asci anfangs im stärkeren Maße gebildet werden als die übrigen Asci. Klarer geht dies aus den Abbildungen 21 und 22 hervor. In Abb.21 sind für einen Versuch die Asci mit 1, 2, 3 und 4 Ascosporen in Prozent der gesamten Asci aufgetragen: Sie zeigt noch einmal den großen Anteil der 4-sporigen Asci an der Sporulation und gleichzeitig, daß diese Asci ihren Endwert

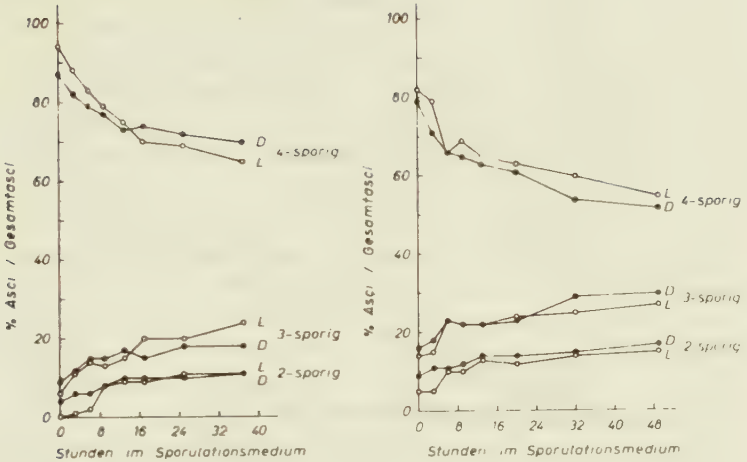

Abb.20 a). Abb.20 b).

Verteilung der Asci nach der Zahl ihrer Sporen in % der Gesamtasci im Weißlicht und im Dunkeln.

a) Zellen aus der 1.Vermehrungsphase, Mittel der Versuche aus Abb.14.

b) Zellen aus der 2.Vermehrungsphase, Mittel der Versuche aus Abb.17.

früher erreichen als die übrigen Asci. In Abb.22 sind für den gleichen Versuch die 1-, 2-, 3- und 4-sporigen Asci an jedem Meßpunkt in Prozent ihres Endwertes aufgetragen: Das frühere Erscheinen der 4-sporigen Asci wird in dieser Darstellung besonders deutlich; weiterhin sieht man, daß die wenigen 1-sporigen Asci, die überhaupt gebildet werden (vergl. Abb.21), erst sehr spät auftreten. Betrachtet man den Einfluß des Lichtes auf die Entwicklung zu 1-, 2-, 3- und 4-sporigen Asci (Abb.20), so ergibt sich für Zellen aus der 1.Vermehrungsphase am Ende der Versuche eine Erniedrigung des Prozentsatzes an 4-sporigen Asci im Licht gegenüber Dunkelheit und eine Erhöhung desjenigen an 3-sporigen.

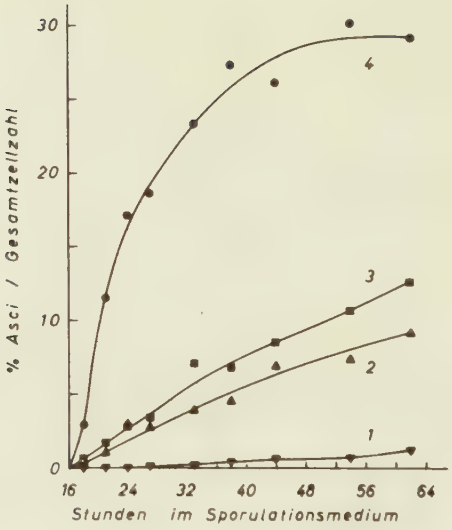

Abb.21. Bildung der 1-, 2-, 3- und 4-sporigen Asci (in % der Gesamtzellzahl) im Verlauf der Sporulation von Zellen aus der 2.Vermehrungsphase.

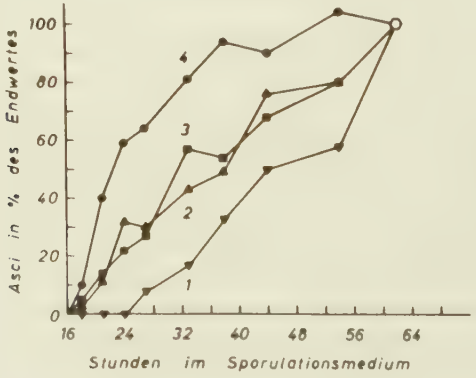

Abb.22. Bildung der 1-, 2-, 3- und 4-sporigen Asci in Prozent ihres Zählwertes am Versuchsende. Versuch wie in Abb.21.

Diese Tendenz ist nicht nur in jedem der 3 Einzelversuche vorhanden, sondern auch in weiteren, hier nicht dargestellten Versuchen mit Zellen aus der gleichen Phase der Vorkultur. Bei der Sporulation von Zellen aus der 2.Vermehrungsphase dagegen sind am Ende die 4-sporigen Asci im Licht etwas erhöht und die 2- und 3-sporigen Asci erniedrigt. Auch für Zellen aus dieser Phase liegen weitere Versuche mit dem gleichen Ergebnis vor. Trotzdem lassen sich diese Unterschiede in der Verteilung der Asci statistisch nicht sichern. Wahrscheinlich ist hierzu eine größere Zahl von Versuchen und innerhalb der Versuche mehr Zählwerte erforderlich (die Zahl der Einzelzählwerte konnte aus methodischen Gründen nicht erhöht werden). In Tabelle 6 sind für die zuvor beschriebenen Versuche die letzten Zählwerte (am Ende des Versuches, Mittel aus 2 parallelen Kolben, von denen je 5 mal 200 Zellen gezählt wurden) und der Fehler als Standardabweichung $S_{\bar{x}}$ angegeben, und zwar a) für die Asci in Prozent der Gesamtzellzahl und b) für die Asci in Prozent der gesamten Asci. Während sich für die Asci mit verschiedener Sporenzahl, bezogen auf die Gesamtasci, kein signifikanter Unterschied zwischen Licht und Dunkelheit ergibt, ist für die Gesamt-Ascuszahl und die Zahl an 4-sporigen Asci, bezogen auf die Gesamtzellzahl, der Unterschied zwischen Licht und Dunkel signifikant.

Da die Zellen nicht synchron sporulieren, sondern die ersten zu Beginn, die letzten gegen Ende eines Zeitraumes von etwa 2 Tagen, geben die Versuche keinen Aufschluß darüber, ob das Licht spezifisch einen bestimmten Prozeß der Sporenbildung hemmt oder ob es die gleichen Stoffwechselprozesse beeinflußt wie bei vegetativen Zellen. Da jedoch, wie aus Abb.14 hervorgeht, von Zellen aus der 1.Vermehrungsphase immerhin mehr als 50% der insgesamt gebildeten Asci in den ersten 10 Std. nach Sporulationsbeginn gebildet werden, war zu hoffen, daß mittels kürzerer Lichtgaben zumindest festzustellen sei, ob das Licht zu einer bestimmten Zeit während der Sporulation einen besonders starken oder aber einen besonders geringen Einfluß hat. Aus den Untersuchungen von PONTEFRACT und MILLER (1962) geht hervor, daß

Tabelle 6. Vergleich des Anteiles 1-, 2-, 3- und 4-sporiger Asci im Weißlicht und im Dunkeln bei je 3 Versuchen mit Zellen aus der 1.Vermehrungsphase (Versuche wie in Abb.14) und aus der 2.Vermehrungsphase (Versuche wie in Abb.17) zum Zeitpunkt der letzten Zählung.

% Asci: Mittel aus 2 parallelen Kolben mit je 5 Einzel-Zählwerten (n = 10);
$S_{\bar{x}}$: Standardabweichung; FG: Freiheitsgrade;
*: signifikanter Unterschied ($p \leq 0{,}01$).

Phase der Vorkultur	Versuch Nr.	Zahl der Sporen im Ascus	a) % Asci pro Gesamt-Zellzahl: Licht % Asci	Licht $S_{\bar{x}}$	Dunkel % Asci	Dunkel $S_{\bar{x}}$	p L - D (FG=18)	b) % Asci pro Gesamt-Asci: Licht % Asci	Licht $S_{\bar{x}}$	Dunkel % Asci	Dunkel $S_{\bar{x}}$	p L - D (FG=18)
erste Vermehrungsphase	1	1	0,25	0,34	0,30	0,25	0,73	0,6	0,92	0,6	0,44	1,0
		2	4,80	1,51	6,10	2,16	0,153	12,0	3,26	10,7	3,44	0,7
		3	9,90	1,72	10,95	2,46	0,31	24,9	5,07	19,2	3,54	0,012
		4	25,25	2,12	39,45	2,70	0,017	62,8	3,52	69,7	3,96	< 0,0002 *
		Gesamt	40,20	1,79	56,80	4,77	< 0,0002 *					
	2	1	0,10	0,24	0,35	0,32	0,07	0,4	0,80	0,7	0,64	0,38
		2	3,80	0,84	5,80	1,72	0,0058 *	10,8	2,31	11,7	3,29	0,50
		3	9,20	1,87	10,25	1,74	0,237	26,1	5,41	20,5	3,77	0,012
		4	22,20	2,91	33,20	1,63	< 0,0002 *	62,8	5,81	67,2	3,52	0,065
		Gesamt	35,30	2,40	49,60	2,90	< 0,0002 *					
	3	1	0,20	0,46	0,25	0,34	0,795	0,5	1,21	0,5	0,67	1,0
		2	3,55	0,85	4,55	0,76	0,017	9,4	1,74	9,3	1,74	0,96
		3	7,60	1,59	7,40	1,30	0,77	19,9	3,21	15,1	2,98	0,0038 *
		4	27,00	2,73	36,95	2,82	< 0,0002 *	70,6	4,46	75,0	3,85	0,025
		Gesamt	38,35	3,90	49,15	1,66	< 0,0002 *					
zweite Vermehrungsphase	1	1	0,60	0,49	0,30	0,40	0,3	1,3	1,19	0,6	0,80	0,295
		2	6,40	1,82	8,40	0,74	0,047	15,1	3,86	16,6	1,63	0,47
		3	9,35	2,48	13,70	2,98	0,017	22,1	5,85	27,0	5,17	0,16
		4	25,90	3,13	28,20	2,90	0,23	61,4	7,05	55,8	4,92	0,16
		Gesamt	42,25	1,64	50,60	3,14	< 0,0002 *					
	2	1	0,95	0,42	0,85	0,90	0,76	2,7	1,10	1,6	1,56	0,10
		2	5,20	1,35	8,45	2,03	0,00085*	14,7	3,35	16,2	3,26	0,33
		3	10,75	2,46	16,50	2,36	< 0,0002 *	30,3	5,85	31,8	4,90	0,26
		4	18,65	2,27	26,30	3,47	< 0,0002 *	52,7	6,91	50,8	4,72	0,50
		Gesamt	35,55	3,00	52,10	4,23	< 0,0002 *					
	3	1	0,60	0,66	1,00	0,59	0,19	1,6	1,91	1,9	0,95	0,68
		2	6,45	1,06	9,85	1,70	< 0,0002 *	16,9	2,91	17,8	2,82	0,50
		3	11,20	2,42	16,80	1,66	< 0,0002 *	30,2	5,74	33,3	3,96	0,195
		4	20,15	2,78	27,70	2,34	< 0,0002 *	52,4	4,56	50,2	3,34	0,3
		Gesamt	38,40	3,78	55,35	3,16	< 0,0002 *					

Tabelle 6. Vergleich des Anteiles 1-, 2-, 3- und 4-sporiger Asci im Weißlicht und im Dunkeln bei je 3 Versuchen mit Zellen aus der 1.Vermehrungsphase (Versuche wie in Abb.14) und aus der 2.Vermehrungsphase (Versuche wie in Abb.17) zum Zeitpunkt der letzten Zählung.

% Asci: Mittel aus 2 parallelen Kolben mit je 5 Einzel-Zählwerten (n=10).
$S_{\bar{x}}$: Standardabweichung.
FG: Freiheitsgrade.
*: signifikanter Unterschied ($p \leq 0{,}01$).

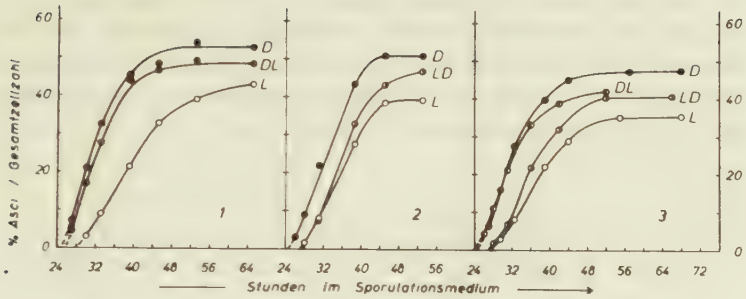

Abb.23. Belichtung zu verschiedenen Zeiten während der Sporulationskultur. Zellen aus der 1.Vermehrungsphase, Weißlicht von 2 x 10 000 Lux.
L: Dauerlicht; LD: 18 Std. Licht, dann Dunkel; DL: 18 Std. Dunkel, dann Licht; D: Dauerdunkel.
Nr. 1, 2 u. 3: drei verschiedene Versuche.

sich unter etwa vergleichbaren Bedingungen (sowohl in Bezug auf das Verhalten des Hefestammes als auch auf die Sporulationsbedingungen) der Vorgang der Meiose über ungefähr 5 Std. erstreckt. Wenn also die ersten Ascosporen 24 Std. nach Übertragung der Zellen in das Sporulationsmedium gebildet werden und der Zeitpunkt maximaler Sporenbildung bei 30 Std. liegt, kann man erwarten, daß nur wenige Zellen schon vor 18 Std. mit der Reifeteilung beginnen. Daher wurden Zellen aus der 1.Vermehrungsphase teils im Dauerweißlicht, teils im Dauerdunkel (= Kontrolle), teils in den ersten 18 Std. im Weißlicht und dann im Dunkeln bzw. in den ersten 18 Std. im Dunkeln und dann im Weißlicht gehalten. Die Ergebnisse sind in Abb.23 dargestellt. Waren die Hefen zu Beginn der Kulturen im Dunkeln und wurden erst nach 18 Std. dem Licht ausgesetzt (s. Versuche 1 und 3), so trat k e i n e Verzögerung der Sporulation ein, wohl aber eine Hemmung (92 bzw. 94% der Dunkelkontrolle), die im Vergleich zum Dauerlicht geringer war (82 bzw. 74% der Dunkelkontrolle). Zellen, die anfangs Licht hatten und nach 18 Std. verdunkelt wurden (s. Versuche 2 und

3), zeigten eine dem Dauerlicht vergleichbare Verzögerung der Sporenbildung, doch war auch hier die Hemmung geringer (85 bzw. 92% der Dunkelkontrolle gegenüber 77 bzw. 74% im Dauerlicht). Abb.24 zeigt das Mittel der Sporulationsraten aus diesen in Abb.23 dargestellten Versuchen. Daraus geht

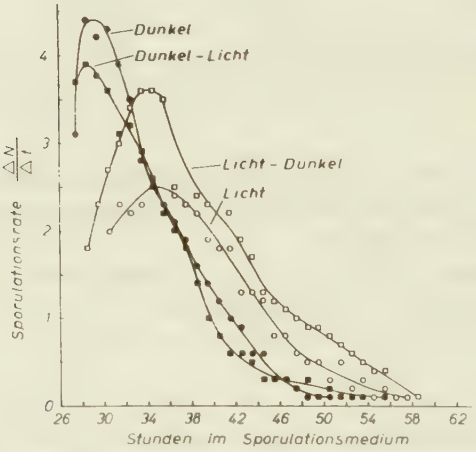

Abb.24. Sporulationsraten, Mittel der in Abb.23 dargestellten Versuche. N = % Asci/Gesamtzellzahl.

hervor, daß die Maxima der Sporulationsraten einerseits für Dauerdunkel und für 18 Std. Dunkel mit nachfolgendem Licht, andererseits für Dauerlicht und für 18 Std. Licht mit nachfolgendem Dunkel jeweils zeitlich zusammenfallen. Diese Versuche - speziell in dieser letzten Darstellung - zeigen noch deutlicher als die vorangegangenen, daß das Licht zwei Vorgänge beeinflußt: die Geschwindigkeit der Prozesse, die zur Sporulation führen und die Zahl der insgesamt gebildeten Asci; verzögernd u n d sporulationshemmend wirkt das Licht nur, wenn es zu Beginn der Sporulationskultur einwirkt, später wirkt es nur noch hemmend. Dabei ist das Ausmaß der Hemmung offenbar abhängig von der D a u e r der Lichtwirkung.

Die in den vorangegangenen Versuchen deutlich gewordene starke Verzögerung des Sporulationsbeginnes von Zellen aus der 1.Vermehrungsphase im Licht legte die Vermutung nahe, daß das Licht hemmend auf die Adaptation zur Acetatoxidation wirkt, besonders da bei den bereits weitgehend adaptierten Zellen aus der 2.Vermehrungsphase im Licht fast keine Verzögerung des Sporulationsbeginnes festzustellen ist. Dabei könnte das Licht entweder die Induktion von Enzymen hemmen, die den Durchtritt von Acetat-Anionen durch die Hefezellwand ermöglichen sollen (DUGGAN 1964), oder aber die adaptive Bildung von Enzymen des Tricarbonsäurecyclus (EATON und KLEIN 1957) bzw. des Glyoxylatcyclus (BARNETT und KORNBERG 1960). Eine Hemmung adaptiver Enzymbildung durch Licht wurde für Hefen z.B. von SULKOWSKI, GUERIN, DEFAYE und SLONIMSKI (1964) beschrieben. Messung der Atmung von Zellen aus der 1.Vermehrungsphase im Licht und im Dunkeln in der Sporulationskultur (Abb.25) ergaben, daß die Atmung im Licht kaum gehemmt ist, und daß das Maximum der Sauerstoffaufnahme im Licht gegenüber Dunkel nicht verschoben, sondern nur etwas

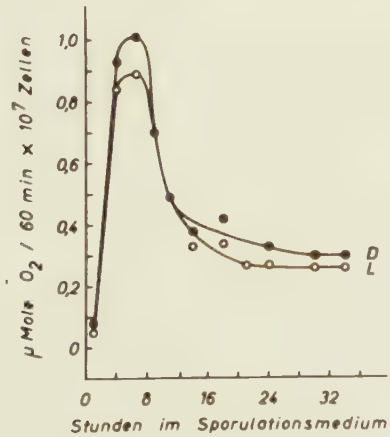

Abb.25. Sauerstoffaufnahme von Zellen aus der 2.Vermehrungsphase in der Sporulationskultur im Weißlicht von 2 x 10 000 Lux und im Dunkeln.

erniedrigt ist. Das Licht kann daher nicht auf eine Adaptation zur Acetatoxidation wirken, möglicherweise aber auf die Acetatassimilation, denn bei Beleuchtung mit 2 mal 15 000 Lux (= 2 x 530 kerg/cm^2 x sec.) betrug die Trockengewichtszunahme der Zellen in der Sporulationskultur nur noch 78% der Dunkelkontrolle, dabei wurden nur 53% Asci der Dunkelkontrolle gebildet.

β) Der Einfluß von hellrotem und blauem Licht.

Trotz der Mannigfaltigkeit der in der Literatur beschriebenen Wirkungen sichtbaren Lichtes auf Pilze herrscht inzwischen weitgehend Übereinstimmung darin, daß bis auf wenige Ausnahmen blaues und violettes Licht der wirksame Teil des Spektrums ist (BANBURY 1959, MOHR 1960, ETZOLD 1960, CARLILE 1965). PURVIS und WARWIK (1907) fanden eine fördernde Wirkung von hellrotem Licht auf die Sporulation von Saccharomyces und eine Hemmung durch blaues und violettes Licht. OPPENOORTH (1957) erhielt bei zwei lichtsensiblen Stämmen von Saccharomyces carlsbergensis ebenfalls eine Förderung durch Hellrot niederer Intensität; alle anderen Spektralbereiche wirkten nach seiner Ansicht wie Dunkelheit.

Eine Förderung der Sporenbildung durch Licht zu erzielen, diese zu analysieren und evtl. in einen Zusammenhang mit der hemmenden Beeinflussung der vegetativen Zellvermehrung durch Licht zu bringen, war - wie bereits eingangs erwähnt - das ursprüngliche Ziel dieser Arbeit, veranlaßt durch die Ergebnisse der Untersuchungen von OPPENOORTH.

Da im Weißlicht nur eine Hemmung der Sporulation gefunden werden konnte, lag die Vermutung nahe, daß eine eventuelle Förderung durch Rotlicht mit einer Hemmwirkung durch Blaulicht überkompensiert und damit verdeckt würde. Um dies zu klären, wurde der Einfluß von hellrotem und blauem Licht untersucht. Abb.26 zeigt den Verlauf der Sporenbildung von Zellen aus der 1.Vermehrungsphase im Dunkeln, im Dauer-Hellrot (600-700 nm, Max. bei etwa 660 nm, 2 x 8,55 kerg/cm^2 mal sec.) und im Dauer-Blaulicht (400-500 nm, Max. bei etwa 450 nm, 2 x 4,07 kerg/cm^2 x sec.). Aus den beiden Versuchen geht deutlich hervor, daß Hellrot - zumindest unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen, wobei die Strahlungsintensität des Rotlichtes etwa der von OPPENOORTH (6,7 kerg/cm^2 x sec.) entsprach, keinen Einfluß auf die Sporenbildung hat, während die Sporulation im Blaulicht verzögert und gehemmt ist. EHRENBERG (1966) konnte für die vegetative Phase dieses Hefestammes ebenfalls keine Hellrotwir-

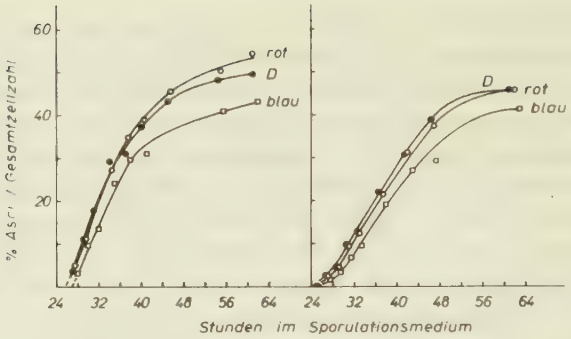

Abb.26. Sporulation von Zellen aus der 1.Vermehrungsphase im hellroten und blauen Licht und im Dunkeln (D).

kung feststellen. Ob noch andere Spektralbereiche außer Blau für die im Weißlicht erhaltene Hemmung der Sporulation mit verantwortlich sind, wurde bisher nicht untersucht.

In der Hoffnung, doch noch eine fördernde Hellrotwirkung auf die Sporulation zu erzielen, wurde eine Reihe von Versuchen mit Saccharomyces carlsbergensis Stamm G_2 durchgeführt, die Herr Dr. Oppenoorth uns freundlicherweise zur Verfügung stellte. Dieser Stamm G_2 war Ausgangsstamm für den in der Arbeit von OPPENOORTH als "Langtagstyp" bezeichneten Stamm S_{40}. Über die Rotlichtwirkung von G_2 schreibt OPPENOORTH: "It took years before one viable spore of G_2 was isolated. G_2 formed scarcely any spores during the eight years before the influence of light was discovered. Now applying the right conditions, G_2 and S_{40} can produce 40% asci or even more." Mit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methode konnte jedoch bei G_2 weder im Dunkeln noch im Hellrot überhaupt eine Sporenbildung erzielt werden. Die Hefen wuchsen zwar in der Vorkultur (mit einer Generationszeit von 3 1/4 Std. in der logarithmischen Wachstumsphase, sie hatten keine 2.Vermehrungsphase), und ihr Aussehen in der Sporulationskultur entsprach nach 30 Std. etwa

dem unserer Hefe nach 20 Std., d.h. sie hatten dichtes granuliertes Plasma, jedoch wurde im weiteren Verlauf der Sporulationskulturen nie ein Ascus beobachtet, sondern die Zellen bildeten große Mengen von Fett.

Natürlich bestand die Möglichkeit, die von OPPENOORTH angegebene Methodik genau zu reproduzieren. Da jedoch nur in vollsynthetischen Medien und bei überschaubaren Sporulationsbedingungen und homogenen Probeentnahmen weitere Analysen möglich sind, konnten Bierwürze und Gipsblöcke hier nicht verwendet werden, zumal die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei der Gipsblockmethode äußerst schlecht ist (OPPENOORTH). Es wurden mit dem Stamm G_2 noch eine Reihe weiterer Versuche angestellt. Um dem geringeren H^+-Gehalt der Gipsblöcke näherzukommen, wurde das Sporulationsmedium auf pH 7,5 gepuffert (Phosphatpuffer). Da außerdem die Hefen auf den Gipsblöcken bei OPPENOORTH Bierwürze erhielten, wodurch sie sich zunächst vegetativ vermehrten, einen Hefekuchen bildeten und dann direkt zur Sporulation übergingen, wurden dem Sporulationsmedium entsprechend dem hohen Wuchsstoffgehalt von Bierwürze Wuchsstoffe (in der Zusammensetzung und Konzentration des Vorkulturmediums nach WICKERHAM) zugefügt. Weiter bestand die Möglichkeit, daß durch die Rotlichtwirkung in den Hefekuchen eine Temperaturerhöhung stattgefunden hatte: so wurde außer bei 26°C auch bei 30 und 35°C gearbeitet. Außerdem könnte bei den von OPPENOORTH angewandten Bedingungen stellenweise eine Austrocknung stattgefunden haben, die von anderen Autoren unter bestimmten Umständen als fördernd für die Sporenbildung gefunden wurde (KLEYN 1954, WEIXL-HOFMANN 1958); daher wurden außer Flüssigkeitskulturen auch Agarplatten (Sporulationsmedium mit 2% Agar) beimpft und mit und ohne Schutz vor Austrocknung und Temperaturerhöhung inkubiert. Daneben wurden Flüssigkeitskulturen mit verschiedenen Konzentrationen (5, 10, 15, 20 %) des osmotisch wirksamen, stoffwechselindifferenten Polyäthylenoxid "Lutrol 9" (BASF) (vergl. SANTARIUS 1961) angesetzt, um eine physiologische Trockenheit zu erzielen. Alle diese Versuchsansätze, mit je einem Faktor oder einer Kombination verschiedener dieser Faktoren

wurden in Hellrot und Dunkelheit durchgeführt. In keinem Falle konnte eine Ascusbildung beobachtet werden. Möglicherweise hat G_2 seine Sporulationsfähigkeit inzwischen ganz verloren, wie dies für Laboratoriumsstämme häufig beschrieben worden ist.

b) Belichtung der Vorkultur. Einfluß auf die verschiedenen Wachstumsphasen sowie auf die nachfolgende Sporulation.

Die vorangegangenen Versuche hatten gezeigt, daß Licht, das auf Zellen im Sporulationsmedium einwirkt, die Sporenbildung der Hefen hemmt. Es ergab sich jedoch bisher kein Hinweis für eine spezifisch nur den Sporulationsprozeß selbst betreffende Lichthemmung. Wie sich aus der sehr auffälligen lichtbedingten Verzögerung der Sporulation von Zellen aus der 1.Vermehrungsphase gegenüber der sehr geringen Verzögerung von Zellen aus der 2.Vermehrungsphase ergibt, werden mindestens z.T. auch unspezifische, der eigentlichen Sporulation vorausgehende, aber die Sporulationsbereitschaft der Zellen bedingende Prozesse durch Licht beeinflußt, die schon während des vegetativen Wachstums in der Vorkultur je nach Länge derselben mehr oder weniger vollständig ablaufen können (s. auch Teil 1 dieser Arbeit). Zur weiteren Klärung dieser Frage, wie weitreichend nämlich der Lichteffekt auf den vegetativen Zustand der Zelle die nachfolgende Sporulation beeinflussen kann, wurden Versuche durchgeführt, in denen die Belichtung der Zellen in die Vorkultur vorverschoben und dann die Sporulation dieser Zellen getestet wurde.

Zunächst mußte die Lichtwirkung auf den Verlauf der Vorkultur selbst untersucht werden. Vollständige Nährlösung wurde in üblicher Weise beimpft und ein Kolben im Dunkeln gehalten, ein anderer 4 Std. nach dem Animpfen Weißlicht von 2 x 10 000 Lux ausgesetzt. Abb.27 zeigt, daß in der 1.Vermehrungsphase die Zellvermehrung annähernd gleich ist, im Licht tritt lediglich eine Verzögerung von 1-2 Std. ein und die 2.Verzögerungsphase kann bei etwas geringerer Zelldichte einsetzen. Auch in der Trockengewichtszunahme, im Glucosegehalt und im Maximum des Äthanolgehaltes der Nährlösung macht sich diese Verzögerung bemerkbar. Ein starker Lichteinfluß wird jedoch erst zur Zeit der 2.Vermehrungsphase sichtbar: die Zellen vermehren sich kaum mehr, d.h. eine typische 2.Vermehrungsphase wird unterdrückt, und ebenso nimmt das Trockengewicht nur noch geringfügig zu. Der pH-Wert der Nährlösung bleibt im Licht niedrig.

Die 2.Vermehrungsphase wird im Licht auch dann weit-

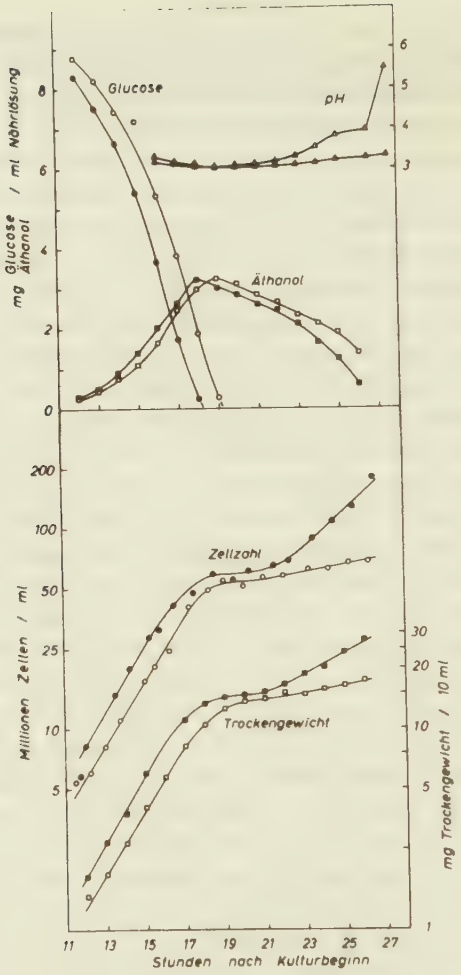

Abb.27. Zellvermehrung und Trockengewicht der Hefen sowie Glucose- und Äthanolgehalt und pH-Wert der Nährlösung in der Vorkultur im Dunkeln (geschlossene Symbole) und im Weißlicht von 20 000 Lux (offene Symbole).

gehend verhindert, wenn die Belichtung nicht schon wenige Stunden nach Animpfen, sondern erst in der späteren 1.Vermehrungsphase bei 1,5 x 10^6 oder sogar erst bei 30 x 10^6 Zellen/ml einsetzt (Abb.28).

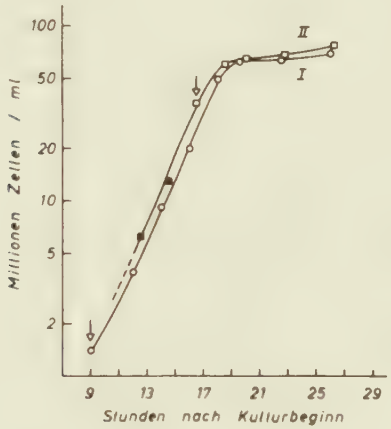

Abb.28. Zellvermehrung in der Vorkultur im Weißlicht von 2 x 10 000 Lux. Die Pfeile geben den Lichtbeginn an.

Zunächst wurde auch hier geprüft, ob die Hemmung der 2.Vermehrungsphase durch Licht über eine Hemmung adaptiv gebildeter Enzyme zur Äthanoloxidation verursacht wird. Messungen des Gaswechsels der Hefen im Licht und im Dunkeln im Verlauf der Kultur zeigten jedoch, daß der Anstieg der O_2-Aufnahme zu Beginn des Bereichs der 2.Vermehrungsphase zwar verzögert, aber nicht nennenswert gehemmt ist (Abb.29). Danach scheint eine Adaptation an die O x i d a t i o n von Äthanol zwar erfolgt zu sein, die Äthanol a s s i m i l a t i o n wird jedoch durch Licht offenbar verhindert.

Wie wirkt sich nun dieser Lichteinfluß auf Zellen in der Vorkultur auf die nachfolgende Sporulation aus? Um das zu prüfen, wurden die Zellen im Dunkeln (D) und im Weißlicht (L) (belichtet ab 15 Std. Vorkulturdauer, bei etwa 30 x 10^6

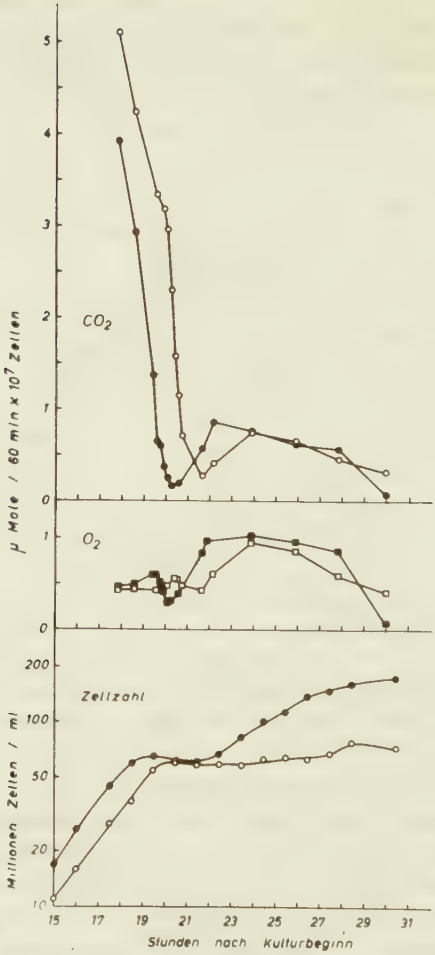

Abb.29. Zellvermehrung und Gaswechsel der Hefen in der Vorkultur im Dunkeln (geschlossene Symbole) und im Weißlicht von 2 x 10 000 Lux (offene Symbole).

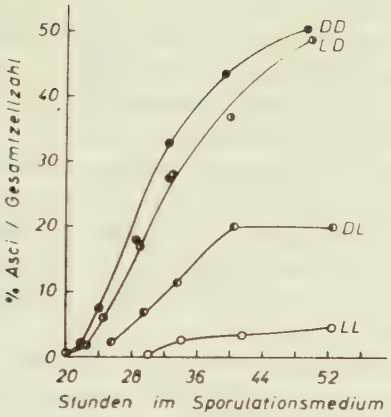

Abb.30. Sporulation von Zellen aus dem Ende der 2.Verzögerungsphase.
DD: Vorkultur und Sporulationskultur im Dunkeln;
DL: Vorkultur im Dunkeln, Sporulationskultur im Licht;
LD: Vorkultur im Licht, Sporulationskultur im Dunkeln;
LL: Vorkultur und Sporulationskultur im Licht.
Beleuchtungsstärke: 2 x 10 000 Lux Weißlicht.

Zellen/ml) vorkultiviert und am Ende der 2.Verzögerungsphase (21 Std. nach Animpfen) zur Sporulation umgesetzt, und zwar wurden Zellen sowohl aus D als auch aus L 1) in je einem Ansatz im Sporulationsmedium im Dunkeln kultiviert: "DD" bzw. "LD", und 2) im Licht: "DL" bzw. "LL", um den zusätzlichen Lichteffekt während der Sporulation nach einer derartigen Vorbelichtung noch festzustellen (Abb.30). Während die in der Vorkultur belichteten Zellen bei der Sporulation im Dunkeln "LD" nur eine geringe Hemmung im Vergleich zur Dunkelkontrolle "DD" zeigen, beträgt die von in der Vorkultur im Dunkeln gehaltenen, in der Sporulationskultur belichteten Zellen "DL" 40% der Dunkelkontrolle und ihr Beginn ist verzögert. Für die während der Vorkultur u n d der Sporulationskultur belichteten Zellen "LL" ist die Verzögerung der

Sporulation noch größer; vor allem ist die Hemmung der Ascusbildung hier außerordentlich stark: nur 0,9% der Dunkelkontrolle "DD" und nur 23% derjenigen von dunkel vorkultivierten, im Sporulationsmedium belichteten Zellen "DL". Der Versuch zeigt, daß sich der hemmende Einfluß des Lichtes auf die vegetative Vermehrung der Zellen in der Vorkultur bei Umsetzen der Zellen zur Sporulation noch in der reproduktiven Phase auswirkt: Erfolgt nach Belichtung in der Vorkultur die Sporulation im Dunkeln, so tritt weitgehende Erholung der Zellen ein, während bei weiterer Belichtung der Zellen auch in der Sporulationskultur die Lichtgaben additiv wirken.

Im Zusammenhang mit der Frage nach der für die 2.Vermehrungsphase verantwortlichen C-Quelle (s.Teil 1, S.15-17) ergab sich, daß mit einer asparaginfreien, im übrigen vollständigen Nährlösung ungefähr der gleiche Effekt erzielt wird wie durch Belichtung der Vorkultur, d.h. es tritt keine 2.Vermehrungsphase auf: Zellvermehrung, Trockengewicht sowie Glucose- und Äthanolgehalt der Nährlösung zeigen einen ähnlichen Verlauf wie bei Belichtung der Vorkultur (Abb.31). Auch hier wird das Atmungsvermögen der Zellen nicht gehemmt sondern nur verzögert (Abb.32).

Ebenso beeinflußt Fehlen von Asparagin die nachfolgende Sporulation, wenn die Zellen am Ende der 2.Verzögerungsphase zur Sporulation umgesetzt werden (Abb33). Zusätzlich wurden die Zellen bei diesem Versuch in der Sporulationskultur belichtet, also "+ Asp.L", "- Asp.L" bzw. "+ Asp.D" und "- Asp.D", in Anlehnung an den entsprechenden, in Abb.30 wiedergegebenen Versuch mit der durch L i c h t erzielten Unterdrückung der 2.Vermehrungsphase. Der Asparaginmangel wirkt sich bei nachfolgender Sporulation im Dunkeln ("- Asp.D" vergleichbar "LD" in Abb.30) in einer Verzögerung und Hemmung der Ascusbildung aus, die allerdings beide etwas ausgeprägter sind als bei "LD". Bei nachfolgender Sporulation im Licht "- Asp.L" ist die Verzögerung und Hemmung der Sporenbildung am größten, jedoch ist hier der Effekt nicht so groß wie bei der lichtinduzierten Verhinderung der 2.Vermehrungsphase ("LL" in Abb.30). Trotz dieser relativ gering-

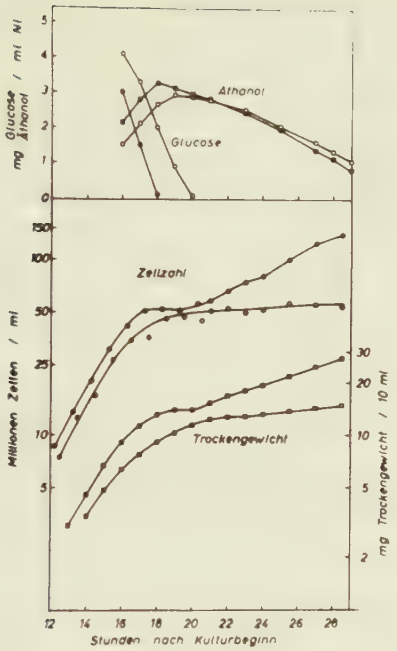

Abb.31. Zellvermehrung und Trockengewicht der Hefen sowie Glucose- und Äthanolgehalt der Nährlösung in der Vorkultur mit Asparagin (geschlossene Symbole) und ohne Asparagin (offene Symbole).

fügigen Abweichungen könnten diese Versuche ein Hinweis dafür sein, daß sekundär durch Licht wie durch Fehlen von Asparagin die gleichen für das Wachstum auf Äthanol sowie für die Sporulation notwendigen Stoffwechselprozesse gehemmt werden.

Im Zusammenhang mit anderen, hier nicht berichteten Untersuchungen, zeigte sich aber, daß die 2.Vermehrungsphase trotz fehlenden Asparagins auftritt, wenn die Nährlösung auf pH 6 gepuffert wird. Dieser Effekt ist mit Phosphatpuffer (Abb.34) wie auch mit Phthalatpuffer (Abb.35) zu erzielen.

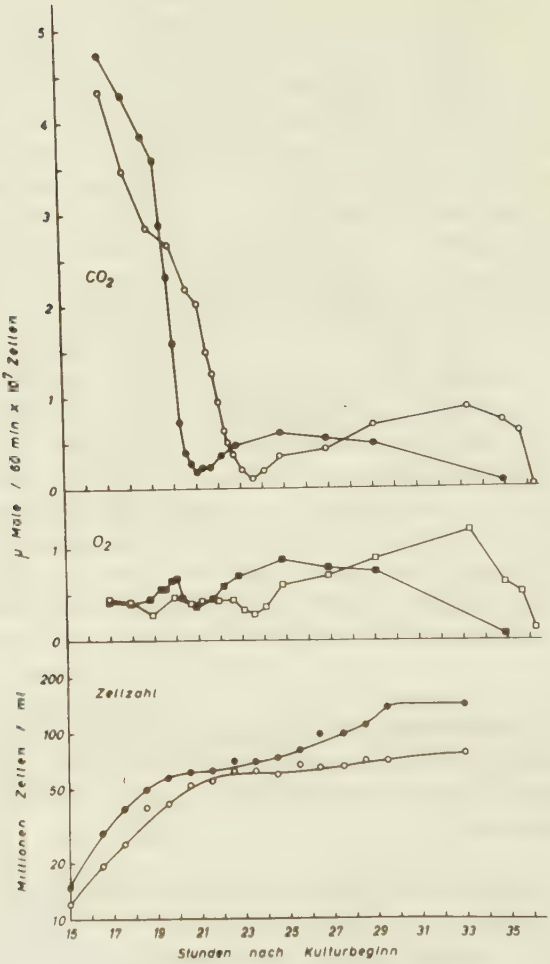

Abb.32. Zellvermehrung und Gaswechsel der Hefen in der Vorkultur mit Asparagin (geschlossene Symbole) und ohne Asparagin (offene Symbole).

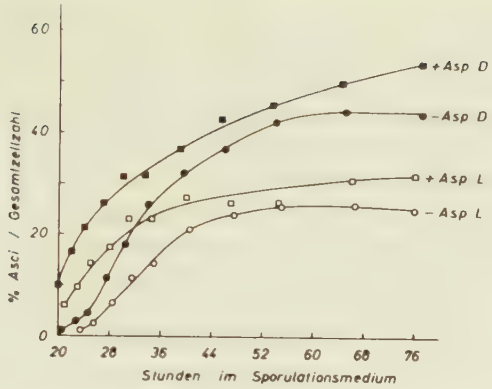

Abb.33. Sporulation von Zellen aus dem Ende der 2.Verzögerungsphase der Vorkultur ± Asparagin.
In der Sporulationskultur Dunkel (D) bzw. Weißlicht (L) von 2 x 10 000 Lux.

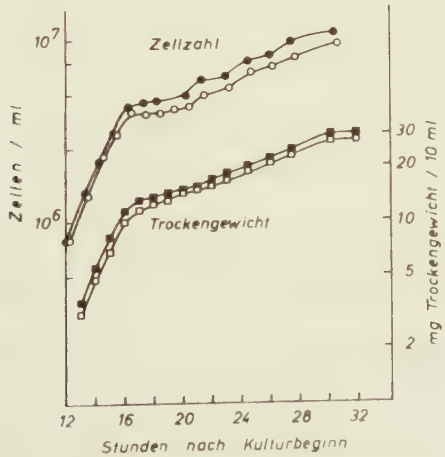

Abb.34. Zellvermehrung und Trockengewicht in Nährlösung ± Asparagin in Phosphatpuffer pH 6.
Geschlossene Symbole: + Asparagin, offene Symbole: - Asparagin.

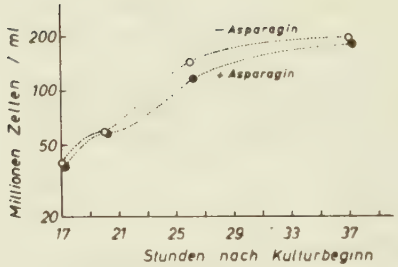

Abb.35. Zellvermehrung in Nährlösung ± Asparagin in Phthalatpuffer pH 6.[1)]

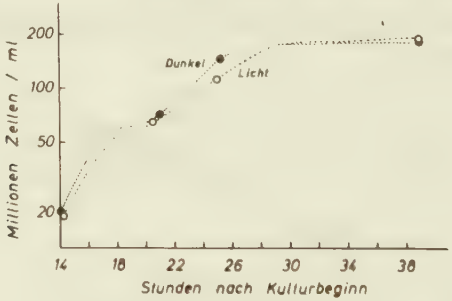

Abb.36. Zellvermehrung in phosphatgepufferter Nährlösung pH 6 im Dunkeln und im Weißlicht von 2 x 10 000 Lux.

Daraufhin wurde untersucht, ob durch Pufferung der Nährlösung mit Phosphatpuffer auch der L i c h t effekt ausbleibt. Dies trat im ersten Versuch (Abb.36) tatsächlich ein, jedoch war in späteren Versuchen dieses Ergebnis nicht reproduzierbar, während dies bei den entsprechenden Aspara-

---

[1)] Bei den Versuchen in Abb.35 und 36 wurde nur an 4 wesentlichen Punkten der Wachstumskurve gemessen und der sich aus anderen Vorkulturversuchen ergebende Verlauf der Zellvermehrung punktiert eingetragen.

ginmangelversuchen immer der Fall war.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß noch weitere, bisher unbekannte Substanzen die 2.Vermehrungsphase verhindern können, nämlich: Durch Verwendung von Ammoniumsulfat p.a. (Fa.Merck) aus neueren Lieferungen wurde die 2.Vermehrungsphase der Hefen ebenfalls vollständig unterdrückt, trotz Anwesenheit von Asparagin, nicht dagegen bei Benutzung von Ammoniumsulfat LAB (für biochemische Zwecke, Fa.Merck). Obwohl die Herstellungsweise und Reinheitsprüfung - wie uns die Firma mitteilte - gleich geblieben sind, müssen bei dem neueren Ammoniumsulfat p.a. ein oder mehrere hemmende Begleitsubstanzen vorhanden sein, die früher nicht darin enthalten waren und die bei den Reinheitsprüfungen nicht erfaßt werden.

IV. Diskussion der Lichtwirkungen.

Die eingangs aufgrund der entsprechenden Literaturhinweise aufgestellte Arbeitshypothese, daß eine Förderung der Sporulation durch Licht über eine Hemmung des vegetativen Wachstums erfolgen könne, ließ sich nicht bestätigen, da ja bei unserem Hefestamm eine lichtinduzierte F ö r d e r u n g der Sporenbildung nicht gefunden werden konnte, sondern unter allen angewandten Bedingungen stets eine H e m m u n g auftrat. Auch wird im Widerspruch zu einer derartigen, auch schon von COCHRANE (1958) aufgestellten Hypothese von CARLILE (1965) die bei Sclerotinia frutigena erhaltene lichtbedingte Förderung sowohl des vegetativen Wachstums als auch der Reproduktion diskutiert. Die hier erhaltenen Ergebnisse widersprechen im gleichen Sinne dieser Hypothese, nur daß hier eine H e m m u n g beider Prozesse beobachtet wurde und außerdem eine Steigerung des Effektes bei Belichtung der vegetativen u n d anschließend der reproduktiven Phase (Abb.30).

Die Sporulation wurde auf zweierlei Weise durch Licht beeinflußt, und zwar führte Weißlicht in den Sporulationskulturen stets zu einer Herabsetzung der Zahl der insgesamt gebildeten Asci und außerdem zu einer Verzögerung der Sporenbildung (s.u.). Das Ausmaß der Hemmung der Ascusbildung überhaupt war abhängig von der Einwirkungsdauer des Lichtes (Abb.23) und von der Beleuchtungsstärke (Abb.19). Bei gleicher Beleuchtungsstärke war die Hemmung unabhängig von der Länge der Vorkultur, d.h. für Zellen aus der 1. und aus der 2.Vermehrungsphase gleich stark (Abb.15). Nicht gleichgültig war dagegen der Zeitabschnitt innerhalb der Sporulationskultur, während dem die Lichteinwirkung erfolgte. Wurde das Licht nicht schon zu Beginn der Sporulationskultur gegeben, sondern erst zu einem späteren Zeitpunkt, d.h. 18 Std. nach Beginn (Abb.23, "DL"), wenn bereits die maximale Atmungsintensität überschritten und die Trockengewichtszunahme weitgehend abgeschlossen war (Abb.11 und 12), jedoch wahrscheinlich nur wenige Zellen bereits mit der Reifeteilung begonnen hatten (vergl.S.45), so war die Hemmung der Sporenbildung

zwar geringer, aber doch noch deutlich. Durch cytologische Untersuchungen, wie sie MILLER (1964) für die Wirkung verschiedener Nähr- und Hemmstoffe und MILLER, KINGSLEY und RAMIREZ (1965) für den Einfluß von Röntgenstrahlen auf die Sporulation durchführten, müßte jetzt festgestellt werden, in welchem Stadium der Sporogenese die Hemmung erfolgt. So fanden diese Autoren, daß sowohl bei Röntgenbestrahlung als auch bei Anwendung von Stoffwechsel-Hemmstoffen vorwiegend die Meiose und nicht die Bildung der Sporenwände gehemmt wird.

Der zweite Effekt des Lichtes, eine Verzögerung des Sporulationsbeginnes, d.h. die Beeinträchtigung der Geschwindigkeit der zur Sporulation führenden Prozesse, kam bei Zellen aus der 1.Vermehrungsphase besonders deutlich zum Ausdruck (Abb.14, 15, 16). In Teil 1 war gezeigt worden, daß unter "Normalbedingungen", also ohne Lichteinwirkung, Zellen aus dieser Phase bis zum Beginn sichtbarer Sporenbildung etwa 10 Std. länger benötigen als Zellen aus der 2.Vermehrungsphase. Dieser Befund ließ darauf schließen, daß durch Stoffwechselprozesse, welche während der 2.Vermehrungsphase in den Zellen ablaufen, die in der Sporulationskultur benötigte Zeit bis zur Ascusbildung verkürzt wird, bzw. daß einige der in der Sporulationskultur ablaufenden Stoffwechselprozesse bereits in der Vorkultur beginnen können. Da nun gerade der Sporulationsbeginn derjenigen Zellen besonders durch Licht verzögert wird, die in der Sporulationskultur längere Zeit bis zum Beginn sichtbarer Sporenbildung brauchen (nämlich Zellen aus der 1.Vermehrungsphase), kann man annehmen, daß das Licht einen Einfluß auf die die Sporulation e i n l e i t e n d e n Stoffwechselprozesse hat. Diese Annahme wird unterstützt durch die Versuche mit Lichtgaben zu verschiedenen Zeiten der Sporulationskultur (Abb.23): Eine Verzögerung tritt nur durch a n f a n g s gegebenes Licht ein. Aus diesen Ergebnissen läßt sich die sehr viel geringere Verzögerung des Sporulationsbeginnes von Zellen aus der 2.Vermehrungsphase dahingehend deuten, daß ein Teil der durch Licht beeinflußbaren Stoffwechselprozesse bereits in der Vorkultur abgelaufen sind. Unterdrückt man durch Licht die 2.Vermeh-

rungsphase, dann werden damit offenbar auch diese die Sporenbildung vorbereitenden Prozesse gestört, denn es kommt bei nachfolgender Sporulationskultur auch im Dunkeln noch zu einer - wenn auch geringen - Verzögerung der Sporenbildung (s.Abb.30, "LD"). Wie auf S.58 ausgeführt wurde, beruht diese relativ g e r i n g e Verzögerung wahrscheinlich auf einer teilweisen Erholung während der dem Licht folgenden Dunkelheit in der Sporulationskultur.

Ein der Lichtwirkung sehr ähnlicher Effekt konnte mit Asparaginmangel in der Vorkultur erzielt werden. Auch durch Asparaginmangel wurde (wie auf S.58-63 ausgeführt) die 2. Vermehrungsphase unterdrückt. Bei den der Belichtung der Vorkultur u n d der Sporulationskultur entsprechenden Versuchen (s.Abb.33 im Vergleich zu Abb.30) wurden gleichsinnige Effekte hervorgerufen. Es werden also auch hier ähnliche Prozesse in der Vorkultur gestört, die nachhaltig die Sporulation beeinflussen. Die Versuche mit gepuffertem Vorkulturmedium, durch die sich zwar das Fehlen von Asparagin (Abb.34 und 35), nicht jedoch die Lichtwirkung (Abb.36) aufheben ließ, könnten allerdings auf eine unterschiedliche Wirkungsweise beider Faktoren hindeuten.

Die Bedeutung des Asparagins für die 2.Vermehrungsphase kann nicht in seiner Eigenschaft als C- oder N-Quelle liegen, da sein Fehlen sonst nicht allein durch Erniedrigung der H^+-Konzentration aufgehoben werden könnte. Daneben wirkt Asparagin auch noch als Wuchsstoff: Nach WHITE und MUNNS (1950) läßt sich ein Biotinmangel bei Hefen weitgehend aufheben, wenn statt NH_4^+-Salzen Asparaginsäure oder Asparagin gegeben wird; setzt man der Nährlösung außerdem noch eine langkettige ungesättigte Fettsäure wie z.B. Ölsäure hinzu, so macht sich ein Fehlen von Biotin überhaupt nicht mehr bemerkbar (SUOMALAINEN und KERÄNEN 1963). Eine Erhöhung des Biotingehaltes in der Nährlösung ohne Asparagin konnte jedoch keine 2.Vermehrungsphase auslösen, wodurch gezeigt ist, daß das Asparaginbedürfnis der Hefen nicht durch einen Biotinmangel verursacht wird.

Möglicherweise fungiert das Asparagin als Acceptor irgendwelcher von den Hefen abgegebener Stoffe, die nur bei

hoher H^+-Konzentration toxisch wirken. So fanden HEICKEN und SPICHER (1959) mit Asparagin eine Reaktivierung von durch Formaldehyd inaktivierten Phagen, wobei sich das Asparagin als Formaldehydacceptor erwies.

Auch durch die auf S.63 mitgeteilten Befunde mit Ammoniumsulfat wird es problematisch, die durch Licht und durch Asparaginmangel erhaltenen Effekte bezüglich der Wirkung auf die 2.Vermehrungsphase in nähere Beziehung zueinander zu bringen. Gemeinsam ist allen diesen Versuchen jedoch die Unterdrückung der 2.Vermehrungsphase - aufgrund welcher Ursachen auch immer - und damit die Verhinderung bzw. Verzögerung von Prozessen, die für die Sporulationsfähigkeit der Zellen von Bedeutung sind, so daß eine Unterdrückung der 2.Vermehrungsphase in der nachfolgenden Sporulationskultur zum gleichen Ergebnis führt (vergl. Abb.30 und 33!).

Abschließend soll noch auf die erhaltenen Unterschiede in der Verteilung der Asci mit 1, 2, 3 und 4 Ascosporen bei unbelichteten und belichteten Kulturen (s.S.39-43) eingegangen werden: Die Zahl der im Licht gegenüber Dunkelheit gebildeten 4-sporigen Asci und der gesamten Asci, bezogen auf die Gesamtzellzahl, war signifikant geringer. Dagegen waren die Unterschiede in der Verteilung der Asci mit verschiedener Sporenzahl, bezogen auf die Gesamt-Ascuszahl, bei belichteten gegenüber unbelichteten Kulturen statistisch nicht zu sichern; trotzdem ließ sich zumindest für Zellen aus der 1.Vermehrungsphase nicht ausschließen, daß durch Licht die Zahl der pro Ascus gebildeten Sporen verändert wird. Bei Röntgenbestrahlung dagegen fanden MILLER, KINGSLEY und RAMIREZ (1965) trotz einer Hemmung der Sporulation auf 11% der Kontrolle keine Unterschiede in der durchschnittlichen Anzahl der Sporen pro Ascus.

Das frühere Erscheinen eines großen Prozentsatzes an 4-sporigen Asci könnte man als Hinweis dafür deuten, daß sie von Zellen mit den besten physiologischen Voraussetzungen für die Sporulation gebildet werden. Dadurch würde auch die, wenn auch geringe, Erniedrigung der 4-sporigen Asci und Erhöhung der 3-sporigen Asci im Licht gegenüber Dunkelheit bei

Zellen aus der 1.Vermehrungsphase verständlich: Zellen aus dieser Phase beginnen sehr spät mit der Sporenbildung, und das Licht hat eine lange Einwirkungszeit; in dieser Zeit könnten die noch zur Sporulation gelangenden Zellen durch das Licht so beeinflußt worden sein, daß einzelne Zellen nur noch 2 oder 3 statt 4 Ascosporen auszubilden vermögen. Für Zellen aus der 2.Vermehrungsphase dagegen ist die Möglichkeit der Einwirkung des Lichtes vor Beginn der Sporenbildung, die hier ja 10 Std. früher einsetzt als bei Zellen aus der 1.Vermehrungsphase (s.Abb.9), zeitlich stark eingeschränkt. Das könnte sich nun dahingehend auswirken, daß die gleich zu Beginn der Sporenbildung entstehenden 4-sporigen Asci noch nicht wesentlich in ihrer Entwicklung gehemmt werden, wohl aber die erst im späteren Verlauf der Ascusbildung in der Kultur vermehrt auftretenden 2- und 3-sporigen Asci, bis zu deren Entwicklungsbeginn das Licht nun etwas länger hatte einwirken können. Der Effekt ist aber auch hier viel schwächer als bei Zellen aus der 1.Vermehrungsphase. - Übrigens läßt sich wohl aus der kürzeren Belichtungsdauer bis zum Beginn der Sporulation auch die geringere lichtinduzierte Verzögerung dieses Beginnes bei Zellen aus der 2.Vermehrungsphase (s.Abb.17 u. 18) mindestens teilweise erklären (vergl. dazu S.65).

V. Zusammenfassung.

Die Zellvermehrung des untersuchten Stammes von Saccharomyces cerevisiae zeigt in WICKERHAMS' Hefe-Morphologie-Medium mit 1% Glucose einen zweiphasigen Verlauf: in der 1.Vermehrungsphase dient Glucose als Substrat und wird vorwiegend fermentativ bis zum Äthylalkohol abgebaut; in der nach einer Verzögerungsphase einsetzenden 2.Vermehrungsphase wird der zuvor in die Nährlösung abgegebene Äthylalkohol oxidativ metabolisiert. Die Verzögerungsphase zwischen den beiden Vermehrungsphasen wird als Adaptationsphase gedeutet. Das als Zellsubstanzzunahme gemessene Wachstum geht der Zellvermehrung weitgehend parallel, ist jedoch in der zwischen den Vermehrungsphasen liegenden 2.Verzögerungsphase weniger gehemmt als die Zellzahl.

Im Verlauf der vegetativen Kultur unterliegen die Zellen physiologischen Veränderungen, die sich bei nachfolgender Sporulation im zeitlichen Verlauf der Sporenbildung, in der Quantität der insgesamt gebildeten Asci und in der Verteilung der Asci mit verschiedener Sporenzahl unterschiedlich auswirken: Zellen aus der 1.Vermehrungsphase haben die ersten sichtbaren Asci ca. 26 Std. nach Übertragung in das Sporulationsmedium, die Sporulation erfolgt im engsten Zeitraum, und etwa 65% der gebildeten Asci sind 4-sporig; für Zellen aus der 2.Verzögerungsphase liegt der Sporulationsbeginn bei ca. 20 Std. nach Umsetzen, die Sporulation erstreckt sich über eine etwas längere Zeit, aber es werden mehr Asci gebildet als von Zellen aus den beiden anderen Phasen und 70% der gebildeten Asci sind 4-sporig; Zellen aus der 2.Vermehrungsphase beginnen schon nach ca. 16 Std. mit sichtbarer Sporenbildung, sie benötigen die längste Zeitspanne für die Sporulation und haben mit 55% den geringsten Anteil 4-sporiger Asci. Die günstigsten Voraussetzungen für die Sporulation haben Zellen aus der 2.Verzögerungsphase.

Weißes und blaues Licht haben stets einen hemmenden Einfluß auf die Sporenbildung. Hellrotes Licht wirkt - zumindest unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen - wie Dunkel.

Für Zellen aus der 1. und 2.Vermehrungsphase der Vorkultur ist bei gleicher Beleuchtungsstärke die Hemmung der Ascusbildung gleich stark. Daneben wird eine bei Zellen aus der 1.Vermehrungsphase besonders deutliche Verzögerung des Beginns der Ascusbildung gefunden, die als Lichteinfluß auf nicht näher charakterisierbare, der eigentlichen Sporulation vorausgehende Stoffwechselprozesse gedeutet wird. Wie weit die Hemmung der Ascusbildung spezifische Sporulationsprozesse wie z.B. die Meiose betrifft, ist aus den bisher erhaltenen Daten nicht zu entnehmen.

Es ist zu vermuten, daß die prozentuale Verteilung der 1-, 2-, 3- und 4-sporigen Asci durch Licht beeinflußt wird, obgleich eine statistische Sicherung der Ergebnisse nicht möglich war.

Versuche zum Einfluß einer Belichtung der Vorkultur auf die nachfolgende Sporulation erbrachten folgende Ergebnisse: In der Vorkultur selbst wird die erste Phase der Zellvermehrung durch Weißlicht kaum beeinflußt, während die zweite Vermehrungsphase fast vollständig unterdrückt wird; das Licht verhindert dabei nicht die Äthanoloxidation, wohl aber die Äthanolassimilation. Belichtung der Vorkultur bewirkt eine geringfügige Hemmung der Sporulation, wenn letztere im Dunkeln erfolgt. Belichtung der Vorkultur sowie der nachfolgenden Sporulationskultur hat demgegenüber eine erhebliche Verstärkung des Lichteffektes auf die Ascusbildung zur Folge.

Ein sich ähnlich wie Licht auswirkender Effekt auf die 2.Vermehrungsphase konnte durch Asparaginmangel in der Vorkultur hervorgerufen werden. Er beeinflußte in vergleichbarer Weise auch die nachfolgende Sporulation. Dieser Effekt ließ sich jedoch - im Gegensatz zu dem durch Licht erzielten - durch Pufferung des Mediums auf pH 6 aufheben.

Literaturverzeichnis.

BANBURY,G.H.: Phototropism of lower plants. In Hdb.d.Pflanzenphysiol. 17/1, 530-574 (1959).

BARNETT,J.A. u. KORNBERG,H.L.: The utilisation by yeasts of acids of the tricarbolic acid cycle. J.gen.Microbiol. 23, 65-82 (1960).

BATTLEY,E.H.: Growth-reactions for Saccharomyces cerevisiae. Physiol.Plantarum 13, 192-203 (1960).

BUCHTA,L.: Über den Einfluß des Lichtes auf die Sprossung der Hefe. Zbl.Bakt.,II.Abt. 41, 340-351 (1914).

BÜCHER,Th. u. REDETZKI,H.: Eine spezifische photometrische Bestimmung von Äthylalkohol auf fermentativem Wege. Klin.Wschr. 29, 615 (1951).

CARLILE,M.J.: The photobiology of fungi. Ann.Rev.Plant Physiol. 16, 175-216 (1965).

COCHRANE,V.W.: Physiology of fungi. Wiley, New York (1958).

DUGGAN,P.F.: Acetate and ethanol oxidation by yeast. Irish Jour.Med.Sci. 457, 19-30 (1964).

EATON,N.R. u. KLEIN,H.P.: The oxidation of glucose and acetate by Saccharomyces cerevisiae. J.Bacteriol. 68, 110-116 (1954).

EATON,N.R. u. KLEIN,H.P.: Studies on the aerobic degradation of glucose by Saccharomyces cerevisiae. Biochem.J. 67, 373-381 (1957).

EHRENBERG,M.: Der Phosphorstoffwechsel von Saccharomyces cerevisiae in Abhängigkeit von intra- und extrazellulärer Phosphatkonzentration. Arch.Mikrobiol. 40, 126-152 (1961).

EHRENBERG,M.: Wirkungen sichtbaren Lichtes auf den Stoffwechsel von Saccharomyces cerevisiae. Ber.dtsch.Bot. Ges. 77 (Sondernummer), (14)-(17) (1964).

EHRENBERG,M.: Wirkungen sichtbaren Lichtes auf Saccharomyces cerevisiae. I. Einfluß verschiedener Faktoren auf die

Höhe des Lichteffektes bei Wachstum und Stoffwechsel. Arch.Mikrobiol. 54, 358-373 (1966).

ETZOLD,H.: Die Wirkungen des Lichtes auf einige Pilze und ihre spektrale Grenze zum Langwelligen hin. Arch.Mikrobiol. 37, 226-244 (1960).

FOWELL,R.R. u. MOORSE,M.E.: Factors controlling the sporulation of yeasts. I. The presporulation phase. Jour. Appl.Bacteriol. 23, 53-68 (1960).

GILVARG,C. u. BLOCH,K.: The utilisation of acetic acid for amino acid synthesis in yeast. J.Biol.Chem. 193, 339-346 (1951).

GOODMAN,J.W. u. ROTHSTEIN,A.: The mechanism of uptake of phosphate by yeast cells. Fed.Proc. 13, 57 (1954).

GREVE,E.: Synchronisation der Ascosporenbildung einer Saccharomyces cerevisiae. Arch.Mikrobiol. 36, 215-218 (1960).

HABOUCHA,J. u. MASSCHELEIN,Ch.A.: Etude d'une déficience respiratoire chez Saccharomyces carlsbergensis. Biochim. Biophys.Acta 38, 1-11 (1960).

HANSEN,E.Chr.: Undersøgelser over Alkoholgjærsvampenes Fysiologi og Morfologi. Compt.-rend.Trav.Lab.Carlsberg 2, 29-102 (1883).

HANSON,R.S., SRINIVASAN,V.R. u. HALVORSON,H.O.: Biochemistry of sporulation. I. Metabolism of acetate by vegetative and sporulating cells. J.Bacteriol. 85, 451-460 (1963).

HAWKER,L.E.: The physiology of reproduction in fungi. Cambridge 1957.

HEICKEN,K. u. SPICHER,G.: Über die Kinetik der Inaktivierung und Reaktivierung von Phagen. Zbl.Bakt. I.Abt.Orig. 175, 11-26 (1959).

HOTCHKISS,R.D.: Gramicidin, Tyrocidine and Tyrothricin. Adv. Enzymol. 4, 153-199 (1943).

HUGGET,A.St.G. u. NIXON,D.A.: Enzymatic determination of blood glucose. Biochem.J. 66, 12 p (1957).

HUTCHINSON,A.H. u. NEWTON,D.: The specific effects of mono-

chromatic light on the growth of yeast. Canad.J.Res. 2, 249-263 (1930).

KLEYN,J.G.: A study of some environmental factors controlling sporulation of yeast using a new sporulation medium. Wallerst.Lab.Comm. 17, 91-102 (1954).

LINDNER,P. u. CZISER,S.: Der Alkohol, ein mehr oder weniger ausgezeichneter Nährstoff für Pilze. Woch.Brauerei 24, 1-6 (1912).

LUNDIN,H.: Über den Einfluß des Sauerstoffs auf die assimilatorische und dissimilatorische Tätigkeit der Hefe. Biochem.Zeitschr. 142, 454 (1923).

MATILE,Ph.: Wirkungen des sichtbaren Lichtes auf die Atmung von Hefe. Ber.schweiz.bot.Ges. 72, 236-261 (1962).

MATILE,Ph. u. FREY-WYSSLING,A.: Atmung und Wachstum von Hefe im Licht. Planta 58, 154-163 (1962).

MILLER,J.J.: A comparison of the effects of several nutrients and inhibitors on yeast meiosis and mitosis. Exp.Cell. Research 33, 46-49 (1964).

MILLER,J.J., CALVIN,J. u. TREMAINE,J.H.: A study of certain factors influencing sporulation of Saccharomyces cerevisiae. Canad.J.Microbiol. 1, 560-573 (1955).

MILLER,J.J. u. HALPERN,C.: The metabolism of yeast sporulation. I. Effect of certain metabolites and inhibitors. Canad.J.Microbiol. 2, 519-537 (1956).

MILLER,J.J. u. HOFFMANN-OSTENHOF,O.: Spore formation and germination in Saccharomyces. Zeitschr.Allg.Mikrobiol. 4, 273-294 (1964).

MILLER,J.J., KINGSLEY,V.V. u. RAMIREZ,G.: Comparative sensitivity to gamma radiation of yeast mitosis and meiosis. Radiation Botany 5, 383-390 (1965).

MOHR,H.: Photomorphogenetische Reaktionssysteme in Pflanzen. Ergebnisse d.Biologie 23, 47-93 (1960).

NAKATA,H.M. u. HALVORSON,H.O.: Biochemical changes occurring during growth and sporulation of Bacillus cereus.

J.Bacteriol. 80, 801-810 (1960).

OGUR,M., JOHN,R.St. u. NAGAI,S.: Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast. Science 125, 928-929 (1957).

OPPENOORTH,W.F.F.: The sporulation of brewing yeasts. Europ. Brew.Convention, Proc. Copenhagen 222-240 (1957).

PÄTAU,K.: Zur statistischen Beurteilung von Meßreihen. (Eine neue t-Tafel). Biol.Zentralblatt 63, 152-168 (1943).

PHAFF,H.J. u. MRAK,E.M.: Sporulation in yeasts. Part I. Wallerst.Lab.Comm. 11, 261-279 (1948).

PHAFF,H.J. u. MRAK,E.M.: Sporulation in yeasts. Part II. Wallerst.Lab.Comm. 12, 29-45 (1949).

PONTEFRACT,R.D. u. MILLER,J.J.: The metabolism of yeast sporulation. IV. Cytological and physiological changes in sporulating cells. Canad.J.Microbiol. 8, 573-584 (1962).

RICHARDS,O.W,: The analysis of growth as illustrated by yeast. Cold Spring Harbor Symposia, Quant.Biol. 2, 157-166 (1934).

SANTARIUS,K.A.: Untersuchungen über die Ursache der Erhöhung der Trockenresistenz bei Bäckerhefe nach Adaptation an hypertonische Lösungen. Diss.Würzburg 1961.

SCHNELL,W.: Elementarmethoden der Statistik. In Hdb.d.Pflanzenzüchtung. Parey 1958.

STOCKHAUSEN,F.: Chem.Zeitung 35, 1197 (1911).

STRUGGER,S.: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2.Aufl., Springer 1949.

SULKOWSKI,E., GUERIN,B. u. DEFAYE,J.: Inhibition of protein synthesis in yeast by low intensities of visible light. Nature 202, 36-39 (1964).

SUOMALAINEN,H. u. KERÄNEN,A.J.A.: The effect of biotin deficiency on the synthesis of fatty acids by yeast. Biochim.Biophys.Acta 70, 493-503 (1963).

SWANSON,W.H. u. CLIFTON,C.E.: Growth and assimilation in

cultures of Saccharomyces cerevisiae. J.Bacteriol. 56, 115-123 (1948).

UMBREIT,W.W., BURRIS,R.H. u. STAUFFER,J.F.: Manometric Techniques. Minneapolis (Burgess) 1957.

WEIXL-HOFMANN,H.: Über die Auslösung von Sporenbildung bei bisher als asporogen geltenden Hefearten. Protoplasma 50, 340-355 (1958).

WHITE,J. u. MUNNS,D.J.: Utilisation of aspartic acid and asparagine by yeast. Nature 165, 111 (1950).

WICKERHAM,L.J.: Taxonomy of yeasts. Technical Bulletin Nr. 1029. Dept.of Agriculture Washington D.C. (1951). Aus: Die Hefen, Bd. 1, S.131. Nürnberg: H.CARL 1960.

Lebenslauf.

Am 26.7.1938 wurde ich, Gisela Keup, als Tochter des Bankkaufmanns Wilhelm Keup und seiner Frau Katharina, geb. Gergler, geboren. 1944 wurde ich in Reitwein im Oderbruch eingeschult, besuchte dann in Cuxhaven von 1945-1949 die Volksschule und von 1949-1953 die dortige Oberrealschule, ab 1953 die Oberrealschule "Klosterschule" in Hamburg, wo ich 1958 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1958 begann ich das Studium der Biologie an der Universität Würzburg. Im Wintersemester 1959/1960 studierte ich in Hamburg und setzte danach das Studium in Würzburg fort.

Meine akademischen Lehrer waren in Botanik: Frau Dr. Ehrenberg, Herr Dr. Huber, Herr Prof. Kandeler, Herr Prof. Simonis, Herr Prof. Volk und Herr Prof. Zeidler, in Chemie: Herr Prof. Fischer, Herr Prof. Hahn und Herr Prof. Heyns, in Hygiene und Mikrobiologie: Herr Prof. Dimmling, Frau Dr. Ehrenberg, Herr Prof. Engel, Herr Dr. Staib und Herr Prof. Weyer, in Zoologie: Herr Prof. Bier, Herr Dr. Jacobs, Herr Prof. Kloft, Herr Prof. Krause, Herr Dr. Neumann, Herr Dr. Schneider und Herr Prof. Wohlfahrt.

Nunmehr bewerbe ich mich erstmals um den Doktorgrad der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Bamberger Fotodruck · Rudolf Rodenbusch